

**Die Metastasierung von heterolog
verpflanzten Humantumoren im Goldhamster
und ihre Beeinflussung**

von

Wolfgang Steinborn

aus

Oppeln/OS

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. E. Müller

Die Metastasierung von heterolog verpflanzten Humantumoren im Goldhamster und ihre Beeinflussung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Wolfgang Steinborn

aus

Oppeln/OS

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr.W.Schiefer
Referent: Professor Dr.E.Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 12.Januar 1971

Unter Anleitung von Prof.Dr.Dr.D.M.Goldenberg,früher Mit-
arbeiter am Pathologischen Institut.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr.E.Müller für die Übernahme des Referates danken,sowie für die jederzeit freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.Dr.D.M.Goldenberg für die Überlassung des Tumormaterials, die Möglichkeit der Mitarbeit in seinem Labor und seine Beratung.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG	1
B. METHODIK	2
1. Tumormaterial und Versuchstiere	2
2. Überpflanzungstechnik	3
3. Untersuchungstechnik	3
4. Histologische Bearbeitung	4
C. BESCHREIBUNG UND BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	4
I. Bildungsvorgang von Metastasen	4
1. Auftreten und Vermehrung von Tumorzellen im Blut	4
2. Anlagerung der Tumorzellen an den Gefäßen	8
3. Versuche, die Anlagerung durch fibrinolytische- und Antikoagulantientherapie zu beeinflussen	9
4. Diskussion der Fibrinolyse- und Antikoagulantientherapie	17
5. Auftreten von Metastasen in den Organen	18
6. Metastasen bei sekundärer Generalisation	20
7. Zeitliches Auftreten der Metastasen und Organbefall	20
II. Beeinflussung der Tumoren und ihrer Metastasierung durch Zytostatika	24
1. Einteilung der Zytostatika	24
2. Wirkung einiger Zytostatika auf die Tumoren	25
3. Besprechung der Ergebnisse	34
4. Morphologische Befunde bei den behandelten Tieren	35
III. Einfluß der operativen Entfernung des Tumorimplantates auf die Lebenszeit der Tiere	41
1. Vergleiche unter den einzelnen Tumorformen	41
2. Deutung der Ergebnisse	45
D. ZUSAMMENFASSUNG	45
E. LITERATURVERZEICHNIS	48

Verwendete Abkürzungen

BT	Backentasche
Gen.	Tiergeneration
K	Kontrolltiere
Lc.	Lympho centrum
Ln.	Lympho nodulus
OP	Resektion(stiere)
OP-K	Kontrolltiere mit Resektion
OP-Th	Tiere mit Resektion und einer Chemotherapie
Th	Tiere mit einer Chemotherapie
Tr.	Truncus
TU	Tumor

A. EINLEITUNG

Krebserkrankungen sind seit vielen Jahrhunderten bekannt und wurden schon von Hippokrates (460-377 v.Chr.) als nicht heilende Geschwüre betrachtet, die ein zerstörendes Wachstum zeigten. Die heutige klinische Definition hat folgenden Wortlaut:

"Krebs ist eine von körpereigenen, in ihrem Zellerbgut für dauernd abgeänderten, Zellen sich ableitende Neubildung von Geweben, welche durch autonomes, fortgesetztes Wuchern eine immer weitergehende Zerstörung von Geweben und Organen hervorruft" (2).

Seit VIRCHOW gilt die Krebszelle als Ausgangspunkt, Einheit und Wesensträger der Krebsgeschwulst. Auf ihn geht auch der Begriff der Metastase zurück. Er unterschied als Erster Primärtumor und Metastase (32).

Die verhängnisvollen Folgen eines Tumors mit bösartigem Charakter zeigen sich in der Fähigkeit, umliegende Organe und Gewebe zu zerstören, in Nachbargewebe einzuwuchern und sich lymphogen und hämatogen im ganzen Organismus durch Bildung von Metastasen zu verbreiten. Dieser Vorgang bildet neben der Karzinogenese selbst ein bedeutendes Problem in der gegenwärtigen Medizin.

Mit unseren Versuchen, die wir an heterolog verpflanzten Humantumoren durchgeführt haben, wollen wir einen Beitrag zur Prüfung der Eignung von Zytostatika gegen Krebsgeschwülste und insbesondere gegen die Metastasierung liefern.

B. METHODIK

1. Tumormaterial und Versuchstiere

Als Versuchstier verwendeten wir den Syrischen Goldhamster (*Mesocricetus auratus*), da seine Backentaschen als Transplantationsort nach BILLINGHAM (3,4,5) besonders geeignet sind. BILLINGHAM und Mitarbeiter bezeichnen sie als einen immunologisch privilegierten Ort, wobei sie annahmen, daß wirtsfremdes Gewebe in der Hamsterbackentasche immunologisch isoliert wird und von dort aus weder Abwehrkräfte im Tier induzieren kann, noch von eventuellen immunologischen Faktoren erreicht werden kann. WITTE, GOLDENBERG und SCHRICKER (33,34) haben wie BILLINGHAM und SILVERS (3,4,5) mit ihren Untersuchungen über die Backentasche des Goldhamsters gezeigt, daß dafür der Mangel von Lymphabflußwegen verantwortlich gemacht werden kann.

Einen weiteren Vorteil als Transplantationsort zeigt die Backentasche in ihrer sehr guten Vaskularisierung und in der leichten, wiederholbaren Herausstülpbarkeit, die eine gute Beobachtung des Tumors gewährleistet.

Für unsere Versuchsreihen wählten wir Tiere mit etwa 60-70 Gramm Körpergewicht einer Zucht aus um möglichst gleiche Voraussetzungen zu erhalten.

Es wurden folgende verschiedene menschliche Tumoren, die bereits von GOLDENBERG in die Backentaschen von Syrischen Goldhamstern erfolgreich über mehrere Generationen verpflanzt worden waren (15-19), getestet:

GW- 127	Ovarialkarzinom	(Generationen 89-98)
GW- 176	Magenkarzinom	(Generationen 51-58)
GBH-228	Ösophaguskarzinom	(Generation 17)
GW- 336	Monstrozelluläres Sarkom	(Generation 12)

Sämtliche Tumoren hatten nach einigen Generationen eine fast 100%ige Transplantationsrate erreicht und wiesen eine starke Metastasierungsfrequenz auf. Im Vergleich zu anderen, früher erfolgreich überpflanzten Tumoren, GW-39 und GW-77 (12-14), zeigten sie ein sehr schnelles Wachstum.

Schon nach etwa 6-7 Tagen mußten die Tumoren neu überpflanzt werden, da sie in der Zwischenzeit ungefähr Kirsch- kerngröße erreicht hatten und ein weiteres Wachstum sie für eine erneute Überpflanzung wegen des Auftretens von Nekrosen in der Regel ungeeignet machte.

2. Überpflanzungstechnik

Für die Herstellung einer Tumorsuspension suchten wir Tumorgewebe eines Transplantattieres aus, das verschiedene Bedingungen erfüllen mußte: 5-6 Tage alt, keine Nekrosen und gute Durchblutung. Nach der Säuberung der Backentasche mit einer leichten, antiseptischen Lösung sind den narkotisierten Tieren (100 mg/kg Evipan-Natrium) die Tumoren mit sterilen Instrumenten entfernt worden. Das Tumorgewebe wurde nach mehrmaligem Reinigen abgewogen und nach der Homogenisierung mit der entsprechenden Menge an Locke-Ringer-Lösung (+5 mg Penicillin +60 mg Streptomycin auf 50 ml) zu einer 7%igen Suspension verdünnt. Davon wurde jedem neuen Versuchstier 0,1 ml in die linke, ausgestülpte Backentasche zwischen die Hautschichten injiziert.

3. Untersuchungstechnik

Das Wachstum der Geschwülste bestimmten wir an ihrer Volumenzunahme mit einer Schublehre. Dazu stülpten wir die Backentasche mit dem Tumor aus dem narkotisierten Tier heraus und errechneten das Volumen durch die drei Messungen von Länge, Breite und Höhe. Das Ergebnis der ersten Volumenbestimmung wurde gleich 1 gesetzt und alle weiteren Messungen darauf als ein Vielfaches davon bezogen. Wir erhielten somit die Wachstumsfaktoren zwischen den einzelnen Messungen. Zur Berechnung eines gehemmten oder gesteigerten Wachstums unter Therapieeinfluß zogen wir als Vergleichsfaktoren die Werte von Kontrolltieren heran, die keine therapeutischen Mittel, sondern nur eine entsprechende Menge an physiologischer NaCl-Lösung im jeweiligen Versuch erhalten hatten (Abb. 1).

Abb. 1 Berechnung der prozentualen Hemmung des Tumorstwachstums.

$H = 100 - \frac{W_1}{W_c} \cdot 100$	H =	proz. Hemmung
	$\frac{W_1}{W_c}$	Wachst.-Faktor (Th-Tiere)
	$\frac{W_c}{W_c}$	Wachst.-Faktor (Kontr.)

Als Applikationsort der Narkotika und der verwendeten Medikamente haben wir die Peritonealhöhle ausgewählt. Bei der Hälfte der Versuchstiere führten wir nach einer bestimmten Anzahl von Wachstumstagen des Tumors eine Resektion der betreffenden Backentasche durch. Die ausgestülpte Backentasche der narkotisierten Tiere wurde auf einer Korkplatte mit Nadeln befestigt und kurz gereinigt. Danach klemmten wir sie möglichst weit vom Tumor entfernt nahe an den Lippen ab und resezierten das Ganze proximal der Klemme. Ausnahmslos überstanden die Tiere diesen Eingriff recht gut und zeigten auch in keinem Fall eine Infektion der Schnittfläche.

4. Histologische Bearbeitung

Die für die histologische Auswertung ausgesuchten Organe oder Körperteile entnahmen wir den Tieren innerhalb von 24 Stunden nach Spontanod und fixierten sie in 10%iger Formalinlösung. Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin und die Färbung der histologischen Präparate mit Hämatoxylin und Eosin.

C. BESCHREIBUNG UND BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

I. Bildungsvorgang von Metastasen

1. Auftreten und Vermehrung von freien Tumorzellen im Blut

Die intravaskuläre Ausbreitung der Krebszellen eines Primärtumors in andere Körperregionen stellt die Grundlage für die Bildung von Metastasen dar. Diese Metastasierung hat z.B. GASTPAR (10) in vier Teilprozesse aufgegliedert:

1. "Ablösung von Krebszellen aus der Muttergeschwulst und ihr Einbruch in kleine Blut- und Lymphgefäße.
2. Ausschwemmung dieser Tumorzellen auf dem Blut- und Lymphweg.
3. Ansiedelung der verschleppten Tumorzellen in einem entfernten Organ.

4. Vermehrung dieser Krebszellen und autonomes Wachstum der Tochtergeschwulst."

Der Einbruch einzelner Tumorzellen oder ganzer Tumorzellverbände in Blutgefäße bzw. Lymphbahnen ist damit der Beginn des Metastasierungsvorganges.

Durch mehrmalige Versuche mit einem unserer metastasierenden, schnell wachsenden Humantumoren (GW-127) haben wir eine Zeitkurve über das Auftreten der ersten lebens- bzw. vermehrungsfähigen Tumorzellen im arteriellen Blut gewinnen können.

Es wurde 70 Hamstern 0,1 ml einer 7%igen Tumorzellsuspension von GW-127 in die linke Backentasche injiziert. Zu verschiedenen Stunden haben wir jeweils drei von diesen Hamstern etwa 2 ml Blut aus der A. carotis communis dextra entnommen und mit gleichen Teilen Locke-Ringer-Lösung verdünnt. Von dieser Blutaufschwemmung wurde 5 neuen Hamstern in beide Backentaschen je 0,5 ml zur Übertragung der im Blut befindlichen Tumorzellen eingepflegt. Bei diesen Tieren wurden spätestens am 15. oder 16. Tag die Backentaschen auf ein Tumorstadium makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Dabei ergab sich folgendes Bild.

Blut, das 1-4 Stunden nach der Tumörüberpflanzung entnommen und sofort wieder neuen Tieren in die Backentaschen injiziert worden war, erbrachte keinen Nachweis von Tumorzellen. Dagegen enthielt das 5-6 Stunden später entnommene Blut offensichtlich lebensfähige Tumorzellen, da wir in 80% der Tiere in den Backentaschen Tumoren erzielen konnten. Diese Tiere wiesen außerdem bei der histologischen Untersuchung Metastasen in der Lunge, der Leber, den Nieren und den Nebennieren auf. Mit den nächsten, zeitlich folgenden Überimpfungen waren zunächst bei dieser Versuchsanordnung keine Tumorzellen nachzuweisen, was auch GASTPAR bei seinen Untersuchungen über Metastasierung und Blutgerinnung vermerkte (10). Er fand bei i.v.-Injektion von S-37-Zellen (Mäuseascites-Tumor) und Vorbehandlung mit Heparin 24 Stunden nach der Inokulation noch eine große Anzahl von Tumorzellen im Blut. Dagegen waren ohne Heparin nach 6 Stunden keine Tu-

morzellen mehr im Blut nachzuweisen. In unserer Versuchsreihe konnten wir mit dem Blut, das nach 24 Stunden Verweildauer des Tumors im Tier entnommen worden war, nur in einer von den 10 injizierten Backentaschen eine Geschwulst erzeugen, die aber außergewöhnlich groß war. Das betroffene Tier lebte etwa doppelt so lange wie andere Vergleichstiere und war nur sehr wenig mit Metastasen befallen. In dem Blut, das wir in den folgenden 5 Tagen entnahmen, waren mit unserer Methode ebenfalls keine Krebszellen aufzufinden. Erst wieder im nach 6 Tagen entnommenen Blut gelang es uns Tumorzellen durch ihre Vermehrung nachzuweisen. Von da an allerdings an allen weiteren Tagen (Abb.2).

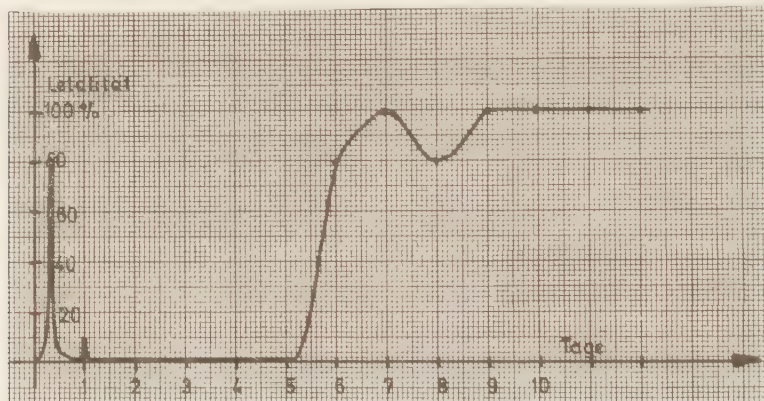


Abb.2 Zeitliches Auftreten von vermehrungsfähigen Tumorzellen im arteriellen Blut. Nachweis durch Übertragung dieses Blutes in die BT neuer, gesunder Hamster mit nachfolgendem Tumorwachstum (GW-127, Gen. 89/92).

Das frühe Auftreten (5-6 Stunden nach Überpflanzung in die BT) und ebenso plötzliche Verschwinden der ersten, nachweisbar lebensfähigen Tumorzellen im Blut versuchen wir uns auf folgende Weise zu erklären.

Während der Injektion der Tumorzellsuspension in die Backentaschen werden zwar häufig kleine Blutgefäße verletzt, doch werden diese wahrscheinlich durch den Quellsungsdruck der eingepfiffen Flüssigkeit solange komprimiert (etwa 5-6 Stunden), bis das umgebende Gewebe die Flüssigkeit

resorbiert hat. Danach waren die Tumorzellen wieder im Blut nachweisbar (1. Schub).

Bei der hämatogenen Ausbreitung der Tumorzellen war das Kapillargebiet der Lunge kein Passagehindernis, was auch ZEIDMAN und Mitarbeiter berichteten (38,39,40). Wir mußten aber feststellen, daß die Zellen bald wieder aus dem Kreislauf verschwanden. Etwa sechs Tage nach Versuchsbeginn kam es überraschenderweise erneut zum massiven Auftreten von vitalen Tumorzellen im peripheren, arteriellen Blut (2. Schub), was wir durch Einbrechen des inzwischen in der Backentasche gewachsenen Tumors in deren Blutgefäße erklären können.

Auf Grund anderer und unserer eigenen bisherigen Versuche müssen wir demnach annehmen, daß sich die Metastasenbildung im Hamster hauptsächlich hämatogen vollzieht und die lymphogene Ausbreitung wegen des Mangels an Lymphgefäßen (3,4,5,33,34) in der Backentasche zumindest anfangs stark in den Hintergrund tritt. Lymphknoten bilden jedoch keine Barriere gegen Tumorzellen. Diese können vielmehr innerhalb weniger Minuten passiert werden, wie FISHER und FISHER berichteten (6).

Obwohl laufend Tumorzellen zugrunde gehen, vermehrt sich die Zahl der freien Geschwulstzellen im Blut sehr stark durch erneutes Eindringen in Gefäße und ungehemmte Teilung der schon im Kreislauf befindlichen Zellen (25, 29,30). Dies bestätigen auch die Letalitätskurven unserer Versuchstiere, denen wir Blut von Hamstern mit überimpften Tumoren in die Backentaschen injiziert hatten, das zu verschiedenen Zeiten entnommen worden war. Ein solches Tumorstadium aus dem überimpften Blut entwickelte sich verschieden schnell und stark, offensichtlich je nach Anzahl der übertragenen Krebszellen. Dem entsprach die Lebenszeit der Tiere (Abb.3).

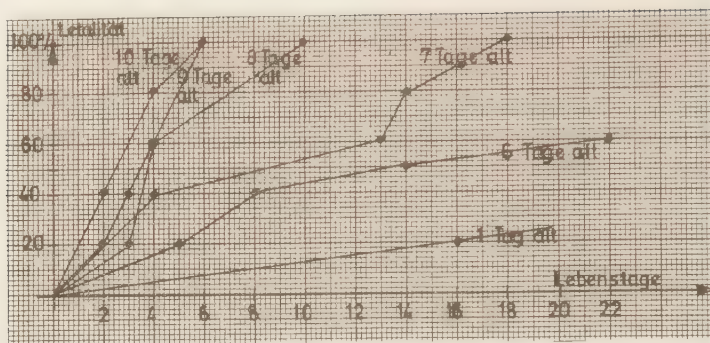


Abb.3 Letalitätskurven der Tiere, die zu verschiedenen Zeiten entnommenes Blut in ihre BT injiziert bekommen hatten.

7 Tage alt = Blut, das einer Versuchsreihe von Tieren 7 Tage nach der Tumoringektion aus der A. carotis communis dextra entnommen und einer anderen Versuchsreihe mit gesunden Tieren in die BT injiziert worden war (GW-127, Gen. 89).

2. Anlagerung der Tumorzellen an den Gefäßen

Emigriert eine Tumorzelle durch das Gefäßendothel, so braucht daraus keine Metastase zu entstehen, da die Tumorzelle jederzeit vom Gewebe aus wieder lymphogen abgeschwemmt werden und von dort erneut in den Kreislauf gelangen kann (11). Man nimmt daher an, daß zur Metastasenbildung die Krebszellen am Gefäßendothel anhaften müssen um so dort ihre Vermehrung beginnen zu können. Als Beispiel besonderer Haftungstendenz fhrt GASTPAR (11) die stark metastasierenden Intestinalkarzinome an, bei denen im peripheren Blut selten Tumorzellen nachzuweisen sind (19%), während die Plattenepithelkarzinome der Pharynx- Larynx-region in 66% Tumorzellen im Blut zeigen bei nur 3% Fernmetastasen. Die Haftung am Gefäßendothel erscheint somit verantwortlich für die Ansiedelung von Tumorzellen, sowie für die weitere metastatische Vermehrung und Ausbreitung. WOOD (35) stellt die primäre Haftung der Tumorzellen, die "cancer cell stickiness" in den Vordergrund und steht auf dem Standpunkt, daß diese unabhängig ist von Kapillardurch-

messer, Durchflußgeschwindigkeit und Vasoaktivität. Man könnte sie als eine Eigenschaft der Zelle selbst ansehen, doch können Faktoren außerhalb der Zelle deren Haftungstendenz beträchtlich erhöhen, z.B. verstärkte Blutgerinnung. Wie sich eine Metastase am Gefäß bilden kann, stellten sich FISHER und FISHER folgendermaßen vor (7):

"Haftung einer Tumorzelle am normalen Gefäßendothel.

Bildung eines Gerinnungsthrombus um die haftende Tumorzelle.

Einschluß von Leukozyten in den Thrombus und nachfolgende Emigration der Leukozyten durch das veränderte Gefäßendothel.

Nachfolgende Penetration der Tumorzelle auf diesem präformierten Weg durch das Endothel.

Extravasale Proliferation."

Das anschließende progressive Wachstum im perivaskulären Raum kann bereits nach Stunden erfolgen (36,37).

3. Versuche, die Anlagerung durch fibrinolytische- und Antikoagulantientherapie zu beeinflussen

Auf Grund dieser Vorstellungen wurden Versuche, die Haftungstendenz der Tumorzellen herabzusetzen und damit eine Verringerung der Metastasenfrequenz zu erreichen, von vielen Autoren unternommen. 1953 führten LARONCE und Mitarbeiter Untersuchungen mit Heparinvorbehandlung durch (22,23). Sie konnten an Kaninchen damit einen Erfolg in der Verhütung von Lungenembolien nach i.v.-Injektion von V2-Karzinoszarkomzellen sehen. Außerdem zeigte sich eine Verringerung der Fernmetastasen bei Heparinnachbehandlung. Ähnliche Ergebnisse brachte eine Plasmintherapie. Sämtliche Autoren haben ihre Beobachtungen an Tiertumoren durchgeführt und dabei wichtige Ergebnisse zeigen können: Eine Erniedrigung der Transplantationsrate, eine Verringerung der Metastasen und eine Verlängerung der Lebenszeit (10). Alle angewandten Mittel wirkten dabei entweder als Antikoagulation oder Fibrinolytika.

Da wir mit menschlichen Tumoren arbeiten konnten, wollten wir die Ergebnisse von FISHER und FISHER (8) und AGOSTINO und CLIFFTON (1) vergleichen und testeten aus den beiden Medikamentengruppen je eine Substanz, Streptase (gereinigte Streptokinase von β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe C (Behring)) und Liquemin (Heparin (Roche)). Die Wirkung überprüften wir auf drei Tumorarten, nämlich GW-127 (Ovarialkarzinom), GW-176 (Magenkarzinom) und GBH-228 (Ösophaguskarzinom).

Fibrinolytische Therapie.

GW-127

Wir begannen eine 7-tägige Therapie in drei Versuchsreihen mit je 15 Tieren 4 Tage nach der Tumorüberpflanzung. Zwei Tage später resezierten wir zusätzlich bei der Hälfte der Tiere die Backentasche zusammen mit dem Tumor (Technik siehe Seite 4). Die Dosis der Streptasebehandlung betrug in beiden Fällen 2×35.000 E/kg/d. Nach Versuchsende fanden wir im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur die entsprechende Menge physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, keine Verringerung der Transplantationsrate (die injizierte Tumorzellsuspension entwickelte bei allen Tieren in der BT eine Geschwulst) und nur teilweise eine Verminderung der Metastasenfrequenz. Bei der Applikation von 2×35.000 E/kg/d Streptase ohne Resektion des Tumors war die Verringerung der Metastasenfrequenz in Niere und Nebenniere am auffallendsten. Alle anderen Organe waren recht verschieden befallen. Jedoch in jedem Fall war eine starke Lungenmetastasierung anzutreffen.

	METASTASENFREQUENZ		
	2x35000 E/kg	2x35000 E/kg +OP	Kontr.-Tiere
Lunge	100 %	100 %	90 %
Leber	33 %	40 %	30 %
Niere	22 %	80 %	60 %
N-Niere	33 %	60 %	60 %

Abb. 4 Metastasenfrequenz in den Organen von Kontroll- und Therapietieren bei GW-127, Gen. 89/90.

Die Lebenszeit der Versuchstiere änderte sich nur geringfügig.

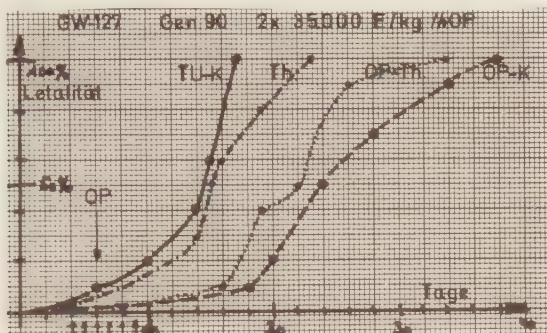


Abb. 5 Letalitätskurven bei GW-127, Gen. 90 unter der Therapie von 2×35.000 E/kg/d Streptase. Kontroll- und Therapietiere mit und ohne Resektion des Tumors.

Auf das Wachstum der Tumoren in der Backentasche hatte die Behandlung mit Streptase keinen Einfluß. Nach Abschluß der Versuche waren alle Tumortransplantate mit oder ohne Therapie in ihrer Wachstumstendenz gleichgeblieben. Eine signifikante Hemmung hatte sich in keinem Fall ergeben.

GW-176

Diese Versuchsreihen mit jeweils wieder 15 Tieren in einer Gruppe wurden mit der schon vorher beschriebenen Technik (siehe Seite 4) durchgeführt. Die Therapie begann 4 Tage nach der Tumorüberpflanzung und die Resektion fand zwei Tage später statt. Unsere Dosierung bei 7-tägiger Medikation von Streptase betrug 50.000 E/kg/d mit Resektion, 100.000 E/kg/d mit Resektion und 100.000 E/kg/d ohne Resektion. Am Ende der Versuche waren die Resultate ähnlich wie bei dem Tumor GW-127. Es ergab sich eine unveränderte Transplantationsrate, lediglich geringe Abweichungen in der Metastasenbildung, überall allerdings eine Verkürzung der Lebenszeit und keine signifikante Tumorchemmung (siehe Abb. 6 und 7). Die Verringerung der Metastasen in Niere und Nebenniere waren in einigen Versuchsgruppen wieder auffallend.

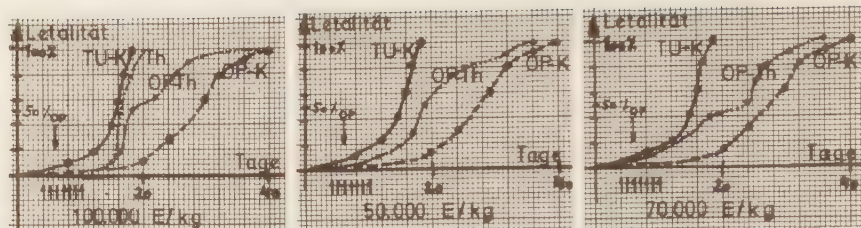


Abb.6 Letalitätskurven unter Streptasetherapie bei GW-176, Gen. 54. Kontroll- und Therapietiere mit und ohne Resektion.

METASTASENFREQUENZ GW-176 Gen 54/58
(in %)

	OP-K	OP+ 50.000 E/kg	OP+ 70.000 E/kg	OP+ 100.000 E/kg	TU-K	100.000 E/kg
Lunge	100	86	100	80	100	89
Leber	40	71	33	50	70	67
Niere	70	57	83	30	70	45
N-Niere	50	29	67	20	70	22

Abb.7 Metastasenfrequenz bei sämtlichen Therapieversuchen mit Streptase bei GW-176, Gen. 54/58.

GBH-228

Nachdem wir bei den vorangegangenen Versuchen mit den Tumoren GW-127 und GW-176 unter sehr hohen Dosierungen mit Streptase nur teilweise günstige Veränderungen an den Tieren beobachten konnten, versuchten wir es bei dem Tumor GBH-228 mit einer niedrigeren Dosis. Der Therapiebeginn war 5 Tage nach der Tumorüberpflanzung und die Resektion 2 Tage später bei insgesamt 7-maliger Therapie und einer Dosis von 25.000 E/kg/d. So entsprach die Lebenserwartung etwa der der Kontrolltiere (Abb. 8). In einem hohen Prozentsatz fanden wir aber Metastasen an ungewöhnlichen Stellen des Körpers, wie z. B. im Herz bei 29% und auf dem Zwerchfell bei 14% der Tiere. Allerdings weist der Tumor GBH-228 auch bei den übrigen Versuchen in viel höherem Maße Herzmetastasen auf (Abb. 9).

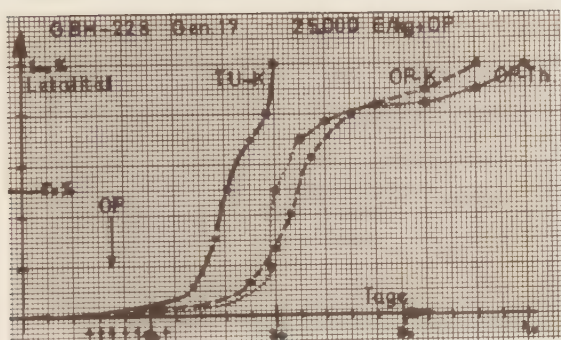


Abb. 8 Letalitätskurven unter Streptasetherapie bei GBH-228, Gen. 17.

	METASTASENFREQUENZ	
	25 000 E/kg + OP	OP-K
Lunge	100 %	86 %
Leber	43 %	43 %
Niere	86 %	86 %
N-Niere	57 %	43 %
Herz	29 %	58 %
Zwerchfell	14 %	0 %

Abb. 9 Metastasenfrequenz bei Therapieversuchen mit Streptase bei GBH-228, Gen. 17.

Gesamtbeurteilung der Streptasebehandlung.

Wir haben an drei verschiedenen Tumoren Streptase als fibrinolytische Substanz in unterschiedlichen Dosierungen im Zusammenhang mit der Bildung von Metastasen und deren mögliche Folgen untersucht. Dabei sind wir zu folgenden Ergebnissen gekommen: Wir erreichten keine Erniedrigung der Transplantationsrate, keine Verlängerung der Lebenszeit, in keinem Fall Hemmung des Tumorwachstums und nur leichte Veränderungen in der Metastasenbildung (Abb. 10). Bei zwei Tumorarten, GW-127 und GW-176, erzielten wir eine prozentuale Verminderung der Metastasenbildung in den Nieren und Nebennieren. Auf den dritten Tumor GBH-228

hatte die niedriger dosierte Streptasebehandlung weniger Einfluß. Es erhöhte sich teilweise sogar der Grad der Metastasierung, wenn auch nur geringfügig.

VERGLEICHSAZAHLEN IM METASTASENBEFALL

TU	Dosis	Niere		N-Niere'	
		K-Tiere	Th-Tiere	K-Tiere	Th-Tiere
GW127	2x35000E/kg	60 %	22 %	60 %	33 %
GW176	50000E/kg	70 %	57 %	50 %	29 %
	100000E/kg	70 %	45 %	70 %	22 %
	100000E/kg+OP	70 %	30 %	50 %	20 %
GBH228	25000E/kg	86 %	86 %	43 %	57 %

Abb. 10 Metastasenbefall unter Streptasetherapie bei GW-127, GW-176 und GBH-228 in Prozent der Tiere, deren Nieren oder Nebennieren bei ihrem Tode befallen waren (insgesamt 150 Tiere).

Antikoagulantientherapie.

Die Behandlung mit Heparin (Liquemin) führte bei GW-127 mit 2x4.000 E/kg/d bzw. 2x2.000 E/kg/d auch nur zu leichten Veränderungen beim Einfluß auf das Tumorstadium, obwohl wir besonders bei Heparin völlige Ungerinnbarkeit des Blutes während der gesamten Therapie vorgefunden hatten (Abb. 11).

BLUTGERINNUNGSZEITEN (Syr. Goldhamster)

	1 x Therapie		8 x Th	
	Zeit	Verhältnis	Zeit	Verh.
Kontrolle	29 min	1	35,5 min	1
Streptase 2x35 000 E/kg	58	2	33,5	1
Heparin 2x4000 E/kg	∞	∞	∞	∞

Abb. 11 Blutgerinnungszeiten, bestimmt durch die Prothrombinzeit, nach verschiedener Therapie, verglichen mit den Werten von Kontrolltieren aus dem gleichen Versuch.

wir haben in unseren Versuchsreihen mit je 15 Tieren einen Tag vor der Tumörüberpflanzung die Therapie begonnen und 9 Tage lang durchgeführt. Verglichen mit der Letalitätskurve der Kontrolltiere ergab sich eine verringerte Lebensdauer der behandelten Versuchstiere, trotz

leicht verlangsamten Tumorwachstums in der Backentasche.

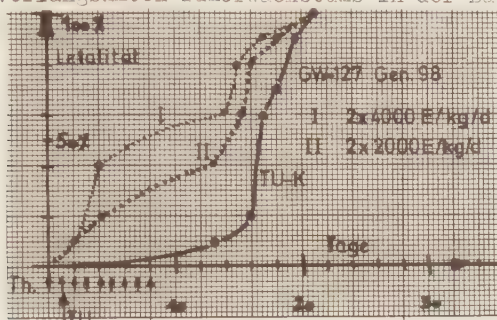


Abb. 12 Letalitätskurven unter Heparintherapie bei GW-127, Gen. 98.

Inwieweit die im Blut befindlichen Tumorzellen bei der Antikoagulantientherapie noch lebensfähig waren untersuchten wir gleich im Anschluß an den vorhergegangenen Versuch. Wir wußten aus eigenen Beobachtungen (siehe Seite 6), daß Tiere mit einem 9-Tage-alten Tumor Krebszellen in ihrem Blut aufweisen und diese durch Übertragung in die Backentasche eines neuen Hamsters wieder einen Tumor bildeten. Dieses Mal ging es darum zu zeigen, ob auch unter Behandlung lebensfähige Tumorzellen im Blut vorhanden sind und diese eventuell in ihrem Verhalten irgendwie verändert sind. Falls Unterschiede zu registrieren wären, hofften wir diese im neuen Tumorwachstum oder in der Lebenszeit der verwendeten Tiere zu beobachten. Um eventuelle Unterschiede besser sichtbar machen zu können verdünnten wir das zu untersuchende Blut noch mit 3 bzw. 6 Teilen Lockeringer-Lösung. Wir untersuchten drei Gruppen mit den beiden Verdünnungsreihen; eine Kontrollgruppe ohne Behandlung, eine mit $2 \times 35.000 \text{ E/kg/d}$ Streptasetherapie und eine mit $2 \times 4.000 \text{ E/kg/d}$ Heparinbehandlung. Für jede Gruppe verwendeten wir 10 Hamster, denen wir in beide Backentaschen je 0,5 ml des zu untersuchenden Blutes injizierten. In den drei Versuchsgruppen zeigte sich ein sehr unterschiedliches Tumorwachstum in der Backentasche, sowie bedeutende Veränderungen der Lebenszeit der Tiere, welche auch durch die verschiedenen Verdünnungsreihen des Blutes entsprechend

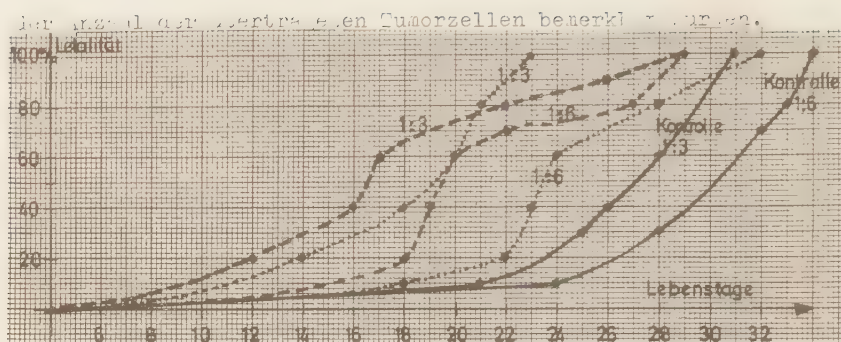


Abb. 13 Letalitätskurven der Tiere, denen verschiedene stark verdünntes, tumorzellhaltiges Blut in ihre BT injiziert worden war (GW-127, Gen. 94).

— Kontrolle
 - - - - 2x35.000 E/kg/d Streptase
 2x 4.000 E/kg/d Heparin

Tiere, die Blut aus Therapieversuchen erhalten hatten verstarben dabei allerdings früher als die Kontrolltiere (Abb. 13 und 14).

MITTLERE LEBENSZEIT (in Tagen)

	Verdünnung	
	1:3	1:6
Kontrolle	28,4 ± 3	31,8 ± 3
Streptase 2x35 000 E/Kg	19,2 ± 2,8	28,0 ± 3
Heparin 2x4 000 E/Kg	20,2 ± 2,9	25,9 ± 3

Abb. 14 Mittlere Lebenszeit der Tiere in Tagen von Abb. 13.

Wir stellten uns deshalb die Frage, ob nicht diese "zytostatische Therapie" mit Streptase oder Heparin zu irgendwelchen Veränderungen der Tumorzellen geführt hatte. WOOD (37) berichtete nämlich Ähnliches über eine Stimulierung durch Zytostatika und Röntgentherapie, wie er sie durchführte, in Richtung einer induzierten erhöhten Klebrigkeit der Oberfläche sowohl der Gefäße als auch der Zellen. Hierzu können auch die Beobachtungen von SEELIG und Mitarbeitern (31) und wieder WOOD (37) für unsere Ergebnisse eine Erklärung sein, die beobachteten, wenn abgetötete oder geschädigte Tumorzellen zusammen mit vitalen übertragen

werden, was auch in unserem Versuch möglich gewesen sein könnte, daß die Metastasenfrequenz erhöht wurde. Nach GASTPAR (10) haben geschädigte Tumorzellen eine höhere Haftungstendenz am Gefäßendothel und bilden auf diese Weise Kristallisationspunkte für die Haftung weiterer vitaler Tumorzellen.

Wir konnten also mit unserem Versuch zeigen, daß sich auch bei hohen Gaben von gerinnungshemmenden Mitteln freie Tumorzellen im Blut befanden, die noch lebensfähig waren. Diese müssen jedoch Veränderungen durchgemacht haben, da sich ihr Verhalten in einem neuen Wirtstier bösartiger in Bezug auf die Lebenszeit der Tiere auswirkte.

4. Diskussion der Fibrinolyse- und Antikoagulantientherapie

GASTPAR (11) zitiert eine Zusammenstellung von Heparin- und Plasminbehandlung im Tierversuch von FISHER und FISHER (7,8). Diese Autoren beobachteten eine Lebermetastasierung bei Ratten nach intraportaler Transplantation von Walker-Karzinomzellen. Sie gaben in einer Gruppe 7.000 E/kg Heparin s.c. 4 Stunden vor der Transplantation und weiter alle 12 Stunden. Je länger die Therapie durchgeführt wurde, desto mehr nahm die Metastasierungstendenz in der Leber ab (bis zu 83%). Beinahe gleichen Erfolg hatte die Behandlung mit Plasmin. Wurde aber die Therapie in beiden Fällen erst nach der Transplantation durchgeführt, so waren die Erfolge geringer. Eine große Zahl von Untersuchern hat dazu auch eine signifikante Senkung der Transplantationsrate bei den verschiedenen Tiertumoren und eine Verlängerung der Lebenszeit gefunden (11). Wie sind diese Ergebnisse mit unseren Erfahrungen zu vereinbaren? Im Gegensatz zu den genannten Autoren haben wir Tumorzellen menschlichen Ursprungs verwendet, als Transplantationsort nicht das Gefäßsystem sondern ein Organ gewählt, die Therapie erst 4-5 Tage nach der Überpflanzung begonnen und einen natürlichen Metastasierungsvorgang im Organismus eines Tieres, ausgehend von einem Implantationstumor in der Backentasche, beobachten können. Wir glauben

deshalb, daß unser Tumormodell sicher eher einen Vergleich mit dem Verhalten von Tumoren in der Humanmedizin gestattet als die Anwendung von Tiertumoren. Einige Autoren (20, 24, 26) haben nachgewiesen, daß manche humantypischen Eigenschaften, wie z.B. das Chromosomenmuster solcher auf Tiere überpflanzter Tumoren erhalten geblieben sind. HERTZ (21) konnte sogar zeigen, wie menschliche Chorionkarzinome, transplantiert in die Backentasche des Hamsters, dort Choriongonadotropes Hormon produzierten.

5. Auftreten von Metastasen in den Organen

Um festzustellen, ob und von welchem Zeitpunkt an sich Metastasen gebildet haben wurde im Abstand von Stunden bis Tagen Hamstern ihr nach der Implantation entstandener Tumor durch einen kleinen Eingriff (siehe Seite 4) wieder entfernt. Wir konnten dabei schon nach 24-stündigem Verweilen der Tumorzellaufschwemmung in der Backentasche bei 10% und nach 48 Stunden bei 50% der Hamster zur Zeit ihres Todes Metastasen nachweisen. Nach 96 Stunden Verweildauer waren sämtliche Tiere bei ihrem Tod mit Tochtergeschwülsten befallen, die sich auf alle wichtigen Organe verteilten.

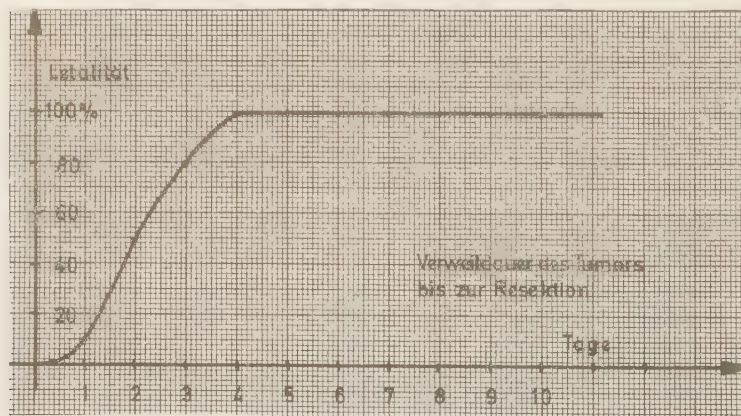


Abb. 15 Prozentuale Manifestierung von Metastasen im zeitlichen Abstand vom Implantationsvorgang (Gw-127, Gen. 75).

Beim Vergleich der beiden Kurven (siehe Abb. 16), zeitliches

Auftreten von Tumorzellen im Blut (Abb.2) und prozentuale Manifestierung von Metastasen (Abb.15) fällt die verhältnismäßig große Zeitspanne auf in der im peripheren Blut tumortragenden Hamstern keine freien vermehrungsfähigen Tumorzellen nachweisbar sind. Daß aber gleichzeitig sich schon Krebszellen irgendwo im Körper abgesiedelt haben müssen, geht aus der später nachgewiesenen Metastasenbildung hervor.

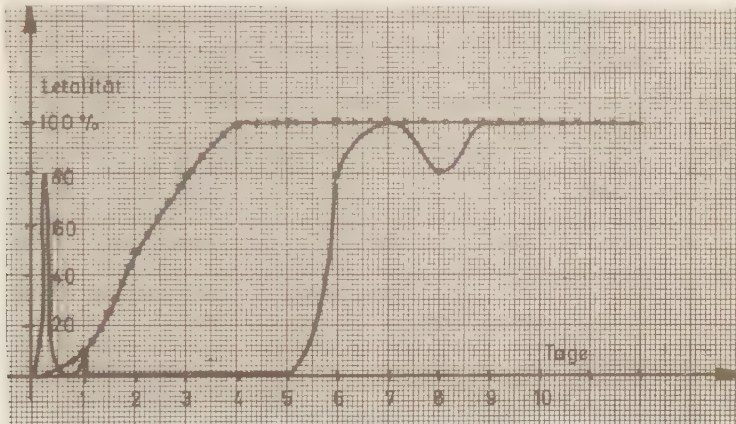


Abb.16 Vergleich der Abb.2 (zeitliches Auftreten von Tumorzellen im Blut) mit Abb.15 (prozentuale Manifestierung von Metastasen).GW-127,Gen.89/92.

Wir haben uns deshalb die Frage gestellt, woran es liegen muß, daß wir während fast 120 Stunden keine Tumorzellen im Blut nachweisen konnten. In diesem Intervall dringen möglicherweise weiterhin ununterbrochen Geschwulstzellen ins Blut ein. Der Organismus hat aber anscheinend die Fähigkeit diese malignen Zellen zu schädigen oder zu vernichten, sodaß sie für uns nicht nachweisbar waren. Es kann auch sein, daß vom Primärtumor erst wieder Tumorzellen ins Blut übertreten wenn er etwa 4-5 Tage nach der Injektion der Zellaufschwemmung in die Backentaschen eine bestimmte Größe erreicht hat und durch schrankenloses Wachstum in Blutgefäße einbricht.

6. Metastasen bei sekundärer Generalisation

Im Laufe unserer ganzen Untersuchungen haben wir gesehen, wie intensiv sich die Tochtergeschwülste eines Tumors von der Backentasche der Goldhamster ausbreiten können. So konnten wir wie mit dem Blut auch im Knochenmark vitale Krebszellen durch Übertragung nachweisen, was der Überpflanzung einer Metastase gleichkommt. Das dabei verwendete Mark entnahmen wir dem Femur solcher Hamster, die mindestens 14 Tage mit dem Tumor GW-127 gelebt hatten und injizierten es in die Backentaschen neuer, gesunder Hamster. Die histologische Auswertung der Organe dieser Tiere, die nun am sekundären Geschwulstwachstum verstorben waren, ergab keinerlei Unterschiede in den Ergebnissen gegenüber Tieren mit dem Primärtumor.

7. Zeitliches Auftreten der Metastasen und Organbefall

Unter Verwendung der vier Tumoren haben wir in mehreren Versuchen die zeitliche Ausbreitung der Metastasen feststellen wollen. Den Verlauf der Metastasierung verfolgten wir an Hand der Sektionen von Hamstern, die zu verschiedenen Zeiten verstorben waren. Wir bildeten dazu drei Gruppen, in denen die Tiere ihrer Lebenszeit nach eingeordnet wurden. Gruppe 1 0-15 Tage, Gruppe 2 16-20 Tage und Gruppe 3 mit 21 und mehr Tage. Für jede Tumorart haben wir 50 Tiere eingesetzt und jeweils Lunge, Leber, Niere und Nebenniere besonders ausgewertet und deren Befall mit Metastasen vermerkt.

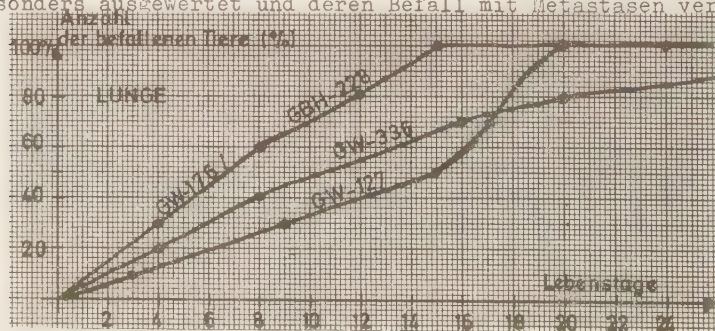


Abb. 18 Erklärung siehe Abb. 21

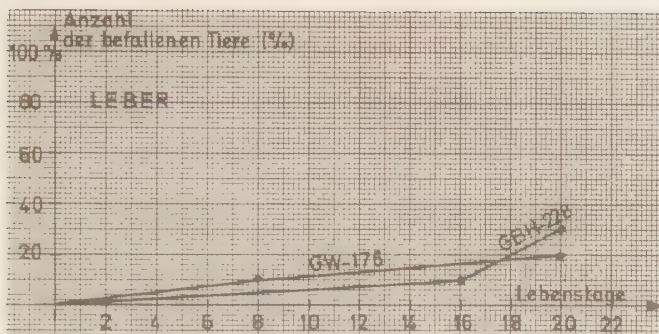


Abb. 19

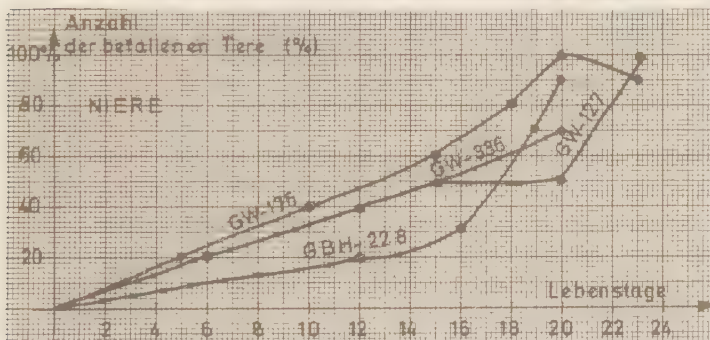


Abb. 20

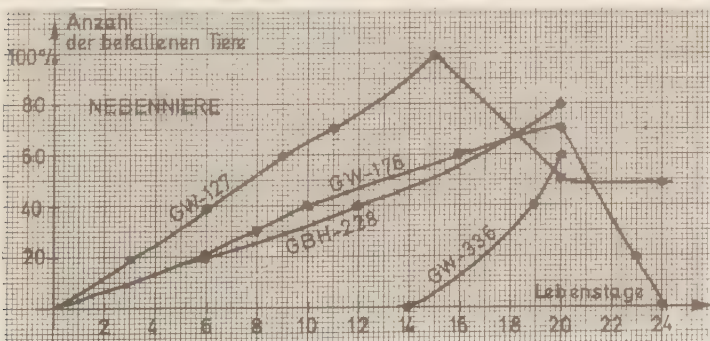


Abb. 21

Abb. 21 und Abb. 18-20

Zeitliche Ausbreitung der Metastasen in Lunge, Leber, Niere und Nebenniere von tumortragenden kontrolltieren, die an verschiedenen Tagen verstorben waren (GW-127, GW-176, GBH-228, GW-336).

Die angegebenen Prozentzahlen in den Kurven (Abb.18-21) und in der Tabelle (Abb.22) beziehen sich auf die mikroskopisch festgestellten metastasenbefallenen Organe der Tiere. Bewertet wurde jedoch nicht der Grad des Befalls, sondern allein das Auftreten von Metastasen.

ANZAHL DER BEFALLENEN KONTROLLTIERE (ohne Therapie!)				
	GW-127	GW-176	GBH-228	GW-336
Lunge	90%	100%	100%	69%
Leber	0%	20%	33%	62%
Niere	60%	70%	67%	56%
N-Niere	60%	55%	84%	31%

Abb.22 Anzahl der Kontrolltiere in Prozent deren betreffende Organe bei ihrem Tod mit Metastasen befallen waren.

Die Metastasenbeteiligung bei Lunge und Niere war bei fast allen Tumorarten etwa gleich stark. Zu vermerken war, daß die Nebenniere zwar im Laufe der Zeit einen Anstieg des Metastasenbefalls zeigte, der jedoch manchmal bei längerer Lebenszeit kleiner war (Abb.21). Dafür konnten wir keine Erklärung finden.

Durchschnittliche Lebensdauer der Tiere bei:

GW - 127	15,5	±3	Tage
GW - 176	17,6	±3	"
GBH-228	17,0	±3	"
GW - 336	15,7	±3	"

Abb.23 Durchschnittliche Lebensdauer der Tiere.

Setzten wir den Befall der Organe mit der durchschnittlichen Lebensdauer (Abb.23) ins Verhältnis, so mußten wir sagen: Bei GBH-228 (Ösophaguskarzinom) breiten sich die Tumorzellen am heftigsten über den gesamten Organismus aus und bilden sehr schnell Metastasen. Als nächste folgen etwa gleich schnell GW-127 (Ovarialkarzinom) und GW-176 (Magenkarzinom). GW-336 (monstrozelluläres Sarkom) breitet sich verhältnismäßig langsam aus. Das Wachstum der Primärtumoren in der Backentasche dagegen entsprach etwa unge-

kehrten Verhältnissen.

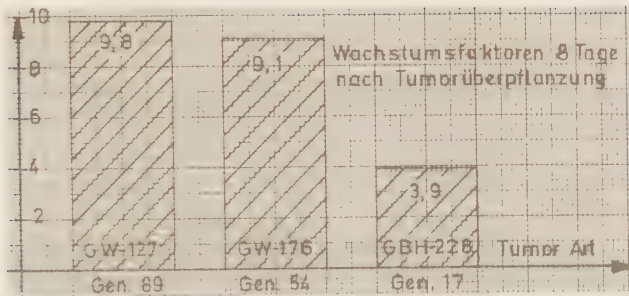


Abb.24 Wachstumsfaktoren der verschiedenen 8-Tage-alten Primartumoren während der Versuche (Kontrolltiere).

GBH-228 besaß nicht nur in der zeitlichen Aussaat der Tumorzellen sondern auch im prozentualen Metastasenbefall eine sehr hohe Relativität. Eine Aufstellung der wichtigsten Organe zeigt, wieviele der verwendeten Kontrolltiere mit Metastasen in diesen Organen verstorben sind (Abb.25). Die niedrige Beteiligung von GW-336 sowie der hohe Prozentsatz der befallenen Nebennieren bei GBH-228 waren auffallend.

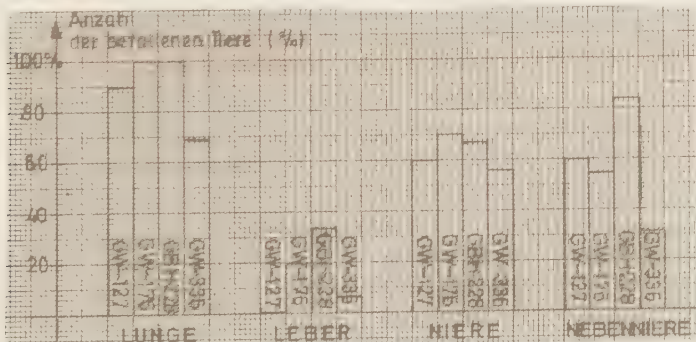


Abb.25 Anzahl der Tiere in Prozent, deren Organe bei ihrem Tod mit Metastasen befallen waren.

Im Allgemeinen konnten wir eine bestimmte Reihenfolge in der Befallszeit beobachten. Regionale Lymphknoten (Hals- und Axillalymphknoten), dann die Lymphknoten im Mediasti-

num und Lungenhilusbereich sowie die Lunge, die Nieren, anschließend die Nebennieren und danach die Leber.

II. Beeinflussung der Tumoren und ihrer Metastasierung durch Zytostatika

Der Vorgang der Metastasenbildung, angefangen vom Einbruch einzelner Tumorzellen ins Blut bis zum histologischen Nachweis der Tochtergeschwülste in den Organen der Wirtstiere ist bei Verwendung der beschriebenen Tumoren gut zu beobachten gewesen. Auf Grund dieser Möglichkeit untersuchten wir auch die Wirkung von einigen Zytostatika auf den Verlauf der Metastasierung, sowie den Einfluß auf das Tumorstadium und die Lebenszeit der Tiere.

1. Einteilung der Zytostatika

Die Einteilung der Zytostatika geschieht nach dem heutigen Stand in fünf Gruppen.

a. Alkylierende Verbindungen

(Vernetzung von hochmolekularen Zellbestandteilen)

z.B. Endoxan
Trenimon
Leukeran
Thio-Tepa

b. Antimetaboliten

(Hemmung im Nukleinsäurestoffwechsel)

z.B. 5-Fluor-uracil
6-Merkaptopurin
Methotrexat
Cytosin-Arabinosid

c. Zytostatisch wirkende Antibiotika

(Hemmung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese)

z.B. Sanamycin
Dactinomycin
Rubicomycin
Mitomycin

d. Alkaloide

(Mitosegifte)

z.B. Colcemid

Velbe

Proresid

VM-26

e. Chemisch uneinheitliche Verbindungen

z.B. Natulan

Myleran

Aus diesen fünf Gruppen der Zytostatika wählten wir sechs Medikamente aus. Dazu kam noch ein proteolytisches Enzymgemisch, welches wir auf seine zytostatische Wirksamkeit überprüfen wollten, da es mitotisch entartete Zellen auflösen und gesunde unbeeinflusst lassen soll. Wir verwandten:

Endoxan (Cyclophosphamid)

Fluoro-Uracil-Roche (5-Fluor-uracil)

Cytosin-Arabinosid (1-B-D-Arabinofuranosylcytosin)

Proresid (Pödoophyllinsäureäthylhydracid)

VM-26 (Podophyllintoxin)

Natulan (Methylhydracinderivat)

Wobe-Mugos (Proteolytisches Enzymgemisch, das nach Firmenangaben aus Rinderpankreas, Kalbsthymus, Pisumsativum, Lens esculenta und Papayotin besteht).

Als Untersuchungsobjekte für diese Zytostatika verwendeten wir die Tumoren GW-127, GW-176 und GBH-228. In allen Versuchen wurden sämtliche Tiere bis zu ihrem Tode beobachtet, dann seziiert, histologisch untersucht und die Auswertung besonders auf die Überlebenszeit der Tiere, das Tumorstadium, das Wachstum in der Backentasche, das Gewichtsverhalten der Tiere und das Vorkommen von Metastasen gerichtet.

2. Wirkung einiger Zytostatika auf diese Tumoren

GW-127 (Ovarialkarzinom)

Wir haben mehrere Versuche mit diesem Tumor unternommen und dabei die Medikamente und die Dosierung, außer in einem Fall, nicht geändert. Im ersten Versuch wurde die Therapie am 4. Tag begonnen, die Resektion der Backentasche

erfolgte am 6.Tag (Gen.89), im zweiten Versuch am 3.bzw. 5.Tag (Gen.90). Beide Resektionstermine fielen zu einem Zeitpunkt statt, bei dem nach unseren vorangegangenen Versuchen über das Auftreten von Tumorzellen im peripheren Blut (siehe Seite 6) die ersten Geschwulstzellen gerade nachweisbar oder noch nicht aufgetreten waren. Dies spiegelte sich auch in den Letalitätskurven wieder (Abb.26-28). Im zweiten Versuch zeigte sich bei den kontrolltieren eine merkliche Lebensverlängerung.

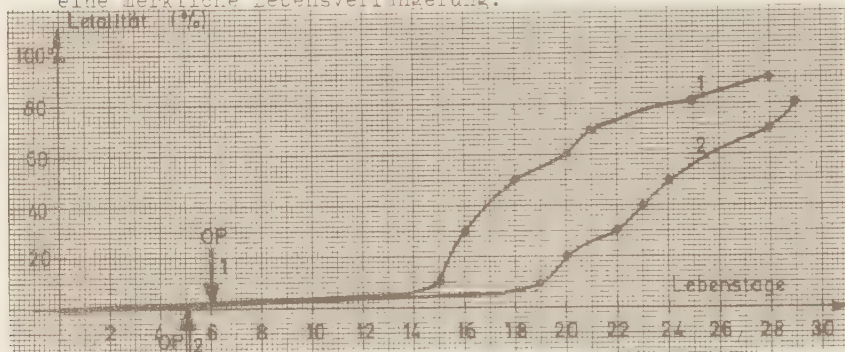


Abb.26 Letalitätskurven der OP-Kontrollen von Versuch 1 und 2 (GW-127, Gen.89/90).

Folgende Medikamente sind in den beiden Versuchen zusätzlich angewendet worden, wobei die Therapie 7 Tage dauerte.

25 mg/kg/d Endoxan	2x7 mg/kg/d Cytosin-Arabinosid
60 mg/kg/d Natulan	3x30 mg/kg/d Wobe-Mugos

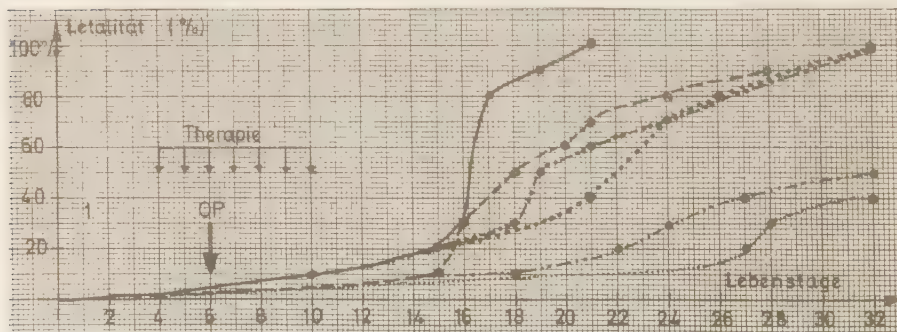


Abb.27 Letalitätskurven von GW-127, Gen.89 bei verschiedener Therapie (Versuch 1).

Eine bedeutende Lebensverlängerung erzielten wir unter der rein zytostatischen Therapie mit Endoxan und Natulan, aber auch unter der kombinierten Behandlung mit Resektion des Tumors.

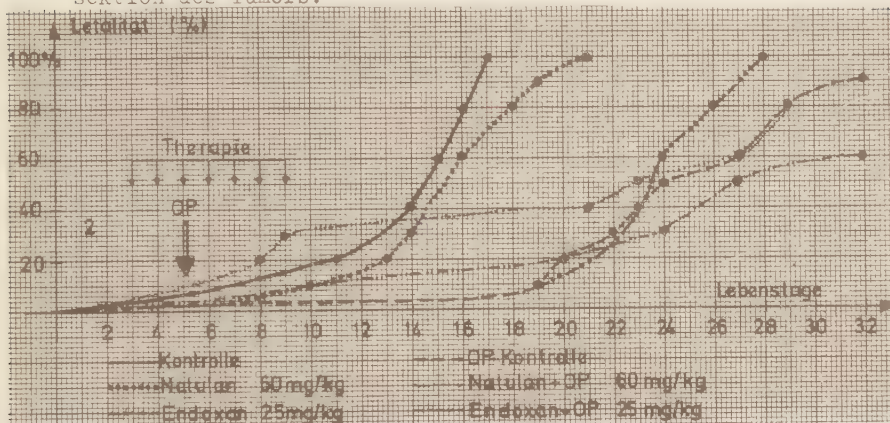


Abb. 28 Letalitätskurven von GW-127,3en.90 bei verschiedener Therapie (Versuch 2).

Obwohl die Dosierung nicht geändert worden war, fanden wir doch beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Lebensverlängerung in Versuch 1 und 2 (siehe auch Abb. 29). In dieser Abbildung haben wir einerseits Tiere mit einer Chemotherapie der Tumorkontrolle und andererseits Tiere aus der gleichen Therapiegruppe, aber mit Entfernung des Tumors, denen der Gruppe OP-Kontrolle gegenübergestellt, wobei sich zeigte, daß der Erfolg der zytostatischen Therapie kombiniert mit der Resektion im Versuch 1 (bei längerer Wachstumszeit des Tumors) größer war als im Versuch 2.

LEBENSVERLÄNGERUNG

	Versuch 1		Versuch 2	
	gegenüb. Kontr.	geg. OP-Kontr.	geg. Kontr.	geg. OP-Kontr.
Endoxan	+35 %	+51 %	+72 %	+12 %
Natulan	+25 %	+47 %	+15 %	-10 %
Cytosin	+7 %	+6 %	+14 %	-18 %
Wobe-Mugos	-12 %	-30 %	+17 %	-22 %

Abb. 29 Lebensverlängerung in Prozent (ausgehend von der mittleren Lebenszeit) aus Versuch 1 und 2 von den Therapiegruppen gegenüber den Kontrolltieren und der OP-Kontrolle (GW-127, Gen. 89/90).

Endoxan und Natulan, beide ohne Resektion des Tumors, erbrachten sogar eine längere Lebenszeit als die OP-Kontrolltiere. Die anderen gegebenen Medikamente zeigten auch in der Hemmung des Tumorwachstums unbefriedigende Ergebnisse. Als gut erwiesen sich hier nur wieder die beiden schon genannten Mittel im ersten, wie im zweiten Versuch.

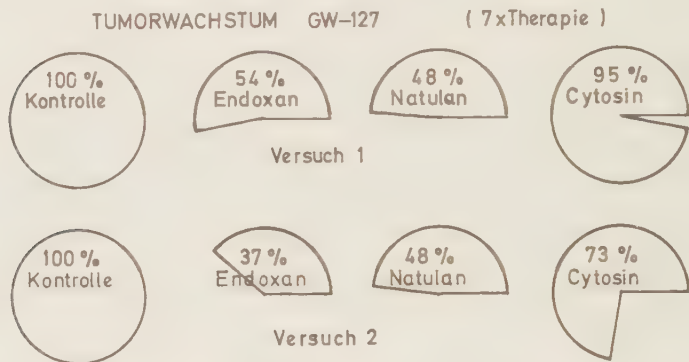


Abb. 30 Wachstumsgröße der Tumoren unter verschiedener Therapie, angegeben in Prozent der Tumorgöße der Kontrolltiere.
Kontrolltiere = 100% (GW-127, Gen. 89/90).

Eigenartig war, daß in Versuch 2 trotz einer relativ stärkeren Hemmung des Tumorwachstums eine größere Lebensverlängerung nicht mehr zu beobachten war, obwohl die Therapie begonnen wurde, noch bevor wir nach unseren Vorversuchen Geschwulstzellen im Blut nachweisen konnten. Die Versuchstiere nahmen nach einer anfänglichen Gewichtszunahme vom 8. Beobachtungstag an rascher an Gewicht ab als im ersten Versuch und kamen somit sehr viel schneller in den tödlichen kachektischen Zustand.

Wir gingen ferner der Frage nach, ob sich nach zytostatischer Vorbehandlung der Tiere Krebszellen ansiedeln können. Diese Untersuchungen, bei denen die Therapie zwei Tage vor der Tumorüberpflanzung begonnen wurde, führten wir mit Medikamenten aus der Reihe der Alkaloide durch, wie Proresid und VM-26, und mit dem Gemisch aus proteolyti-

schen Enzymen.

	Versuch 1	Versuch 2
Proresid	2 x 100 mg/kg	2 x 200 mg/kg
VM 26	2 x 1 "	2 x 2 "
Wobe-Mugos	3 x 30 "	20 mg/kg +
		35000E/kg Streptase

Abb.31 Dosierung der Medikamente.

Bei keinem der verwendeten Mittel konnten wir eine Lebensverlängerung sehen. Lediglich nach 8-tägiger Therapie zeigte sich unter VM-26 eine leichte Hemmung von 23% im Wachstum der Tumorbildung in der Backentasche. Bei den übrigen Medikamenten war das Wachstum sogar teilweise verstärkt. Die Kombination von Streptase mit Wobe-Mugos ergab keinen Hemmungseffekt im Tumorstadium und auch keine Lebensverlängerung obwohl eine fibrinolytische Therapie mit einer "zytostatischen" gekoppelt war.

Obwohl die Gefäßversorgung der Hamsterbackentasche sehr gut ist und damit Zytostatika, die sich eher im Blut befanden als die Tumorzellen in der Backentasche, den Tumor hätten leicht angehen können, kam es zu keiner Verstärkung der zytostatischen Wirkung gegenüber den Versuchen mit Therapiebeginn nach Überpflanzung. Die angewandten Medikamente vermochten nicht die Geschwulstzellen gleich anfangs so zu beeinträchtigen, daß ihr Wachstum eingeschränkt worden wäre. Doch konnten wir mit der im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchung eine Veränderung der Krebszellen in ihrem Verhalten durch die verwendeten Zytostatika zeigen.

Mit der Methode der Überpflanzung tumorzellhaltigen Blutes versuchten wir die Eigenschaften der Tumorzellen unter dem Einfluß zytostatischer Behandlung zu überprüfen. Nachdem der Tumor 9 Tage in der Backentasche der Hamster gewachsen war und damit nach unseren Erfahrungen sicher Tumorzellen im Blut vorhanden waren, entnahmen wir aus jeder Versuchsgruppe 5 Hamster Blut, verdünnten es mit 3 bzw. 6 Teilen Locke-Ringer-Lösung und injizierten davon gesunden Tieren in die Backentaschen. Dieses Mal beobachteten wir nur die Lebenszeit der Tiere (Abb.32). Die

Tumorzellen aus dem Blut der mit Zytostatika behandelten Tiere begannen nach ihrer Übertragung auf neue, gesunde Hamster ein so malignes Wachstum, daß diese Tiere viel eher als die Kontrolltiere verstarben.

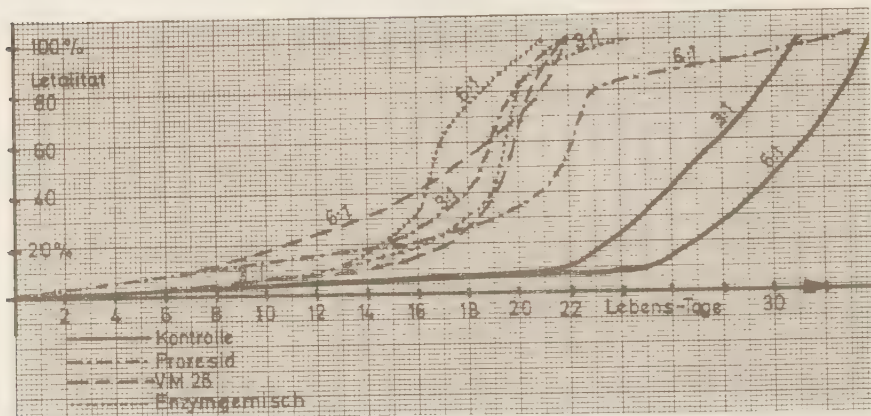


Abb.32 Letalitätskurven von Tieren, die unterschiedlich verdünntes, tumorzellhaltiges Blut in die Backentaschen erhalten hatten (siehe auch Abb.13) GW-127, Gen.94.

GW-176 (Magenkarzinom)

GW-176, ebenfalls ein sehr schnell wachsender Tumor, der stark metastasiert und eine sehr hohe Transplantationsrate besitzt. Auch in diesem Fall haben wir die beiden gut wirkenden Mittel Endoxan und Natulan in der gleichen Dosierung wie bei GW-127 verwendet. Zusätzlich prüften wir noch Fluoro-uracil und das Enzymgemisch Wobe-Mugos in mehreren Dosierungen. Fluoro-uracil mit 20 mg/kg/d und Wobe-Mugos mit 40, 60 und 4x30 mg/kg/d. Die 7-tägige Therapie begann 4 Tage nach der Tumorüberpflanzung und die Entfernung des Tumors fand 2 Tage später statt. Die Resektion erbrachte bei GW-176 eine ziemlich große Lebensverlängerung (60%).

MITTLERE LEBENSDAUER

Kontrolle	17,6 ±32 Tage
OR-Kontrolle	28,2 ±34 "

Abb.33

Mittlere Lebensdauer
(GW-176, Gen.58).

Die besten Erfolge erzielten auch hier wieder Endoxan und Natulan, wobei Natulan dieses Mal eindeutig überlegen war.

LEBENSVERLÄNGERUNG (%)

	gegenüber Kontr.	gegen OP-Kontr.
Endoxan+OP	+ 71	+ 11
Natulan+OP	+ 69	+ 13
FU +OP	+ 67	+ 10
OP-Kontr	+ 60	—
Kontrolle	—	- 38
Endoxan	+ 14	- 29
Natulan	+ 80	+ 12
FU	+ 35	- 35

Abb.34 Lebensverlängerung (ausgehend von der mittleren Lebenszeit) von behandelten Tieren, angegeben in Prozent gegenüber der Kontrollreihe und der OP-Kontrolle.
FU = Fluoro-uracil (GW-176, Gen.58).

Tiere, die nur Natulan erhalten hatten, lebten etwa genauso lange wie die, bei denen zusätzlich die Resektion der Geschwulst durchgeführt worden war.

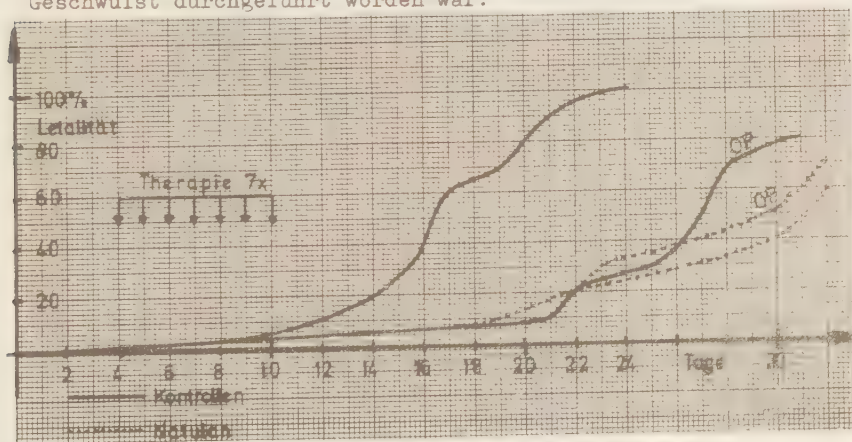


Abb.35 Letalitätskurven bei GW-176, Gen.58 unter Natulanbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren, mit und ohne Resektion.

So groß auch die Unterschiede in der Lebenszeit unter Endoxan und Natulan waren, so gering waren sie in der in beiden Fällen verhältnismäßig großen Hemmung des Tumor-

wachstums (Abb.37,38).

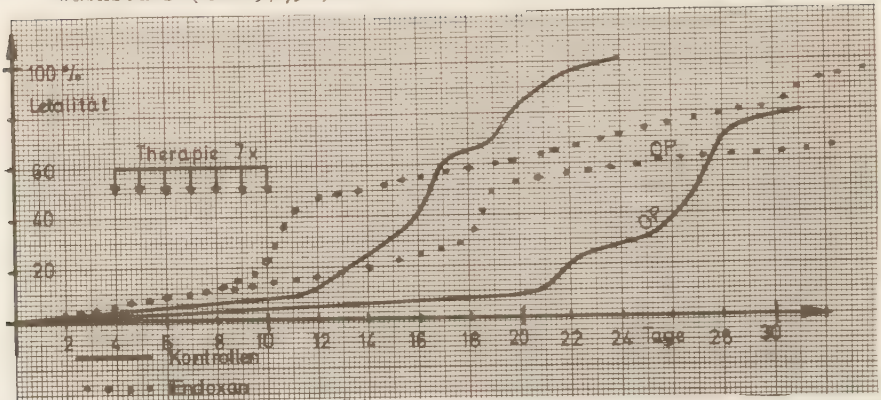


Abb.36 Letalitätskurven bei GW-176, Gen.58 unter Endoxanbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren, mit und ohne Resektion.

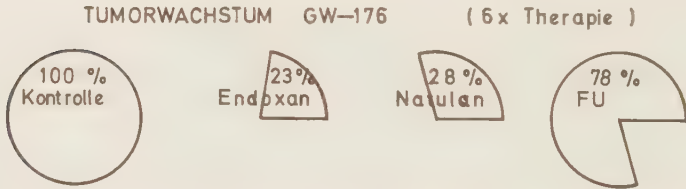


Abb.37 Wachstumsgröße der Tumoren unter verschiedener Therapie, angegeben in Prozent der Tumorgröße von Kontrolltieren.
kontrolltier = 100% (GW-176, Gen.58).

Fluoro-uracil und Wobe-Mugos bewirkten ebenfalls eine Beeinträchtigung des Geschwulstwachstums, doch jedesmal mit einer Verkürzung der Lebenszeit verbunden. Niedrigere Dosierung dagegen ergaben unbefriedigende Ergebnisse.

GBH-228 (Ösophaguskarzinom)

Bei diesem Tumor pruften wir Endoxan mit 30 mg/kg/d und Wobe-Mugos mit einer Dosis von 50 mg/kg/d. Die Letalitätskurven zeigten nur einen lebensverlängernden Effekt bei Endoxan. In der Wachstumshehmung erbrachte das Enzym-

gemisch fast keinen Erfolg (Abb.40).

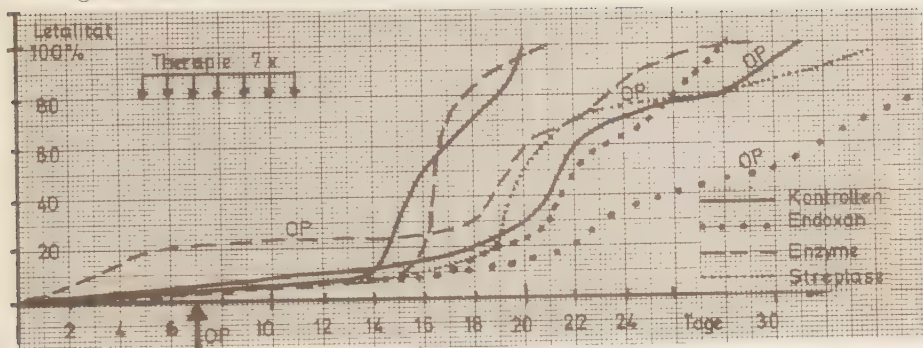


Abb.38 Letalitätskurven von GBH-228, Gen.17 mit und ohne Therapie.

LEBENSVERLÄNGERUNG

	gegenüber der Kontrolle	gegenüb. OP-Kontr.
Endoxan+OP	+ 86 %	+ 29 %
Enzyme+OP	+ 10 %	- 17 %
Endoxan	+ 36 %	+ 2 %
Enzyme	+ 06 %	- 24 %

Abb.39 Lebensverlängerung von behandelten Tieren, angegeben in Prozent der mittleren Lebenszeit der Kontrolltiere und der OP-K. (GBH-228, Gen.17).

Alle Werte konnten jedoch bei weitem nicht die Wachstums-
hemmungen bei den anderen Tumoren erreichen.

TUMORWACHSTUM GBH-228 (5x Therapie)

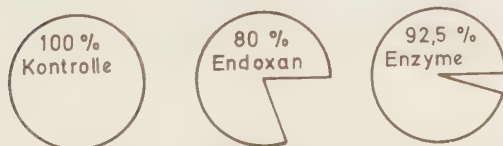


Abb.40 Wachstumsgröße der Tumoren unter Therapie in Prozent der Tumorgöße von Kontrolltieren. Kontrolltiere = 100% (GBH-228, Gen.17).

Das Gewichtsverhalten der Tiere im Versuch bei GBH-228 war

bemerkenswert. Sämtliche Hamster, auch die Kontrolltiere, nahmen während der Therapie kontinuierlich und etwa gleich stark an Gewicht ab.

Alle drei Komponenten, die geringe Lebensverlängerung, die minimale Hemmung des Geschwulstwachstums und der sehr bald einsetzende, starke Gewichtsverlust deuten auf eine hohe Unbeeinflussbarkeit und Malignität von GBH-228 hin, die später bei der mikroskopischen Untersuchung der Metastasen bestätigt werden konnte.

3. Besprechung der Ergebnisse

Bei allen unseren Chemotherapieversuchen hatten sich zwei Medikamente ausgezeichnet bewährt. Beide sind bekannte und in der Klinik erfolgreich angewandte Zytostatika: Endoxan und Natulan. Eine Tabelle zeigt Vergleichszahlen der drei Tumorarten, die aus Messungen unter gleichen Bedingungen stammen. Alle drei Tumoren sprachen auf die Zytostatika unterschiedlich an, so bewies in der Lebensverlängerung hauptsächlich Natulan am Tumor GW-176 seine positive Wirkung mit 80% gegenüber 14% von Endoxan. Dafür zeigte Endoxan eine ziemlich beständige Wirkung an den Tumoren GW-127 und GBH-228 (35% und 36%).

VERGLEICHSZAHLEN (%)

	GW-127		GW-176		GBH-228	
	H	LZ/ K	H	LZ/ K	H	LZ/ K
Endoxan	46	+ 35	78,3	+ 14	20	+ 36
Natulan	52	+ 25	55-75	+ 80	—	—
FU	—	—	22	- 14	—	—
OP- Kntrol	—	+ 26	—	+ 60	—	+ 33
	—	LZ/ OP-K	—	LZ/ OP-K	—	LZ/ OP-K
End. + OP		+ 51		+ 11		+ 29
Nat. + OP		+ 47		+ 13		—
FU + OP		—		+ 10		—

Erkl. Endoxan 25 mg/kg H= Hemmung
 Natulan 60 mg/kg LZ/ K= Lebenzeit gegen Kontrolle
 FU 60 mg/kg

Abb. 41 Tabelle mit Vergleichszahlen, deren Prozentwerte das Verhalten der Tumoren aufzeigen.

Beide Chemotherapeutika haben auch bei unseren Untersuchungen bewiesen, daß sie eine wichtige Rolle in der Krebsbehandlung besitzen. Sie zeigen einige Abweichungen voneinander, die vielleicht auf eine Spezifität der Tumoren zurückzuführen sind. Fluoro-uracil, Cytosin-Arabinosid, Antikoagulantien- bzw. Fibrinolysetherapie und das proteolytische Enzymgemisch Wobegon zeigen dagegen in unseren Versuchsreihen recht unterschiedliche und teilweise geringe oder fehlende Erfolge.

4. Morphologische Befunde bei den behandelten Tieren

Regression oder ein Anhalten im Wachstum der Tumoren unter Chemotherapie bedeutet in der Krebsbehandlung einen großen Erfolg. Metastasenverhütung und -bekämpfung steht heute im Vordergrund jeder Therapie.

Wir versuchten den Metastasierungsweg zu verfolgen und haben dafür ungefähr 350 Tiere aus allen unseren Versuchsreihen seziert, histologisch untersucht und ausgewertet. Alle Hamster sind zu verschiedenen Zeiten an dem Tumor und seinen Folgen verstorben. Etwa bei der Hälfte der Tiere wurde das Transplantat nach 5-6 Tagen entfernt, so daß wir auch den Resektionseffekt auf das Leben der Tiere auswerten konnten. Für die histologische Untersuchung entnahmen wir außer dem Tumor die Hals- und Axillenlymphknoten, Herz und Lunge samt Mediastinum, die Leber, Milz, Nieren und Nebennieren. Ferner alle schon makroskopisch veränderten Teile. Die Metastasen an Rippen, Sternum, Wirbelkörpern und Peritoneum faßten wir zu einem Oberbegriff, "besondere lymphatische Metastasen" zusammen, da sie sicherlich aus den dort verlaufenden Lymphbahnen entstanden sind. Die Metastasen am Peritoneum lagen nach unseren Beobachtungen genau an den Stellen, bei denen am Goldhamster die Lymphverbindung zwischen dem ductus thoracicus lateralis und dem truncus femoralis verläuft. Außerdem liegt dort der ln. subilicus, der wahrscheinlich für das Entstehen dieser Metastasen mitverantwortlich war (siehe Abb. 42).

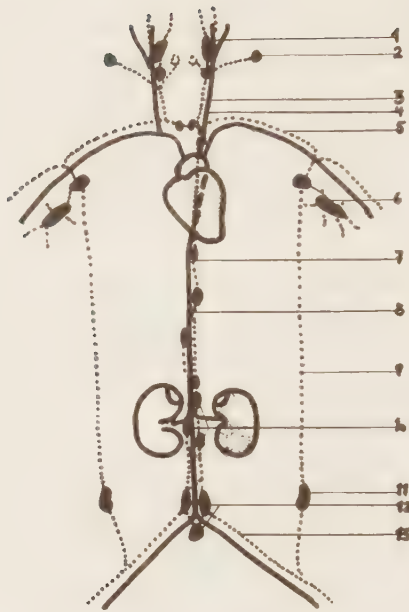


Abb.42

Schematische Zeichnung der arteriellen Blutgefäße und der Lymphwege mit den entsprechenden Lymphknoten.

- | | | |
|------------|------------------|---------------------|
| Erklärung: | 1 Lc.submentale | 8 Aorta abdominalis |
| | 2 Ln.parotidicus | 9 D.thoracicus lat. |
| | 3 Tr.jugularis | 10 Ln.renalis |
| | 4 A.carotis com. | 11 Ln.subilicus |
| | 5 Tr.brachialis | 12 Ln.ilicus |
| | 6 Ln.axillaris | 13 Tr.femoralis |
| | 7 D.thoracicus | |

Anhand der meist befallenen Organe haben wir einen Überblick über die Möglichkeiten der Metastasenbildung und auch der Stärke des Befalls gewonnen.

Wir konnten bei den verwendeten Tumoren manchmal geringe Unterschiede mikroskopisch wie auch makroskopisch in der Art der Metastasen in den Organen feststellen.

Die Halslymphknoten, das Lc.submentale, waren bei allen Tumoren beidseitig befallen und vergrößert, oft jedoch die linke Seite stärker (die transplantierten Tumoren befanden sich in der linken Backentasche). Erreichten diese Lymphknoten, wie es bei Gw-127 häufig der Fall war, beson-

dere Größe (bis zu 10 mm Ø), so waren sie fast immer mit dem Tumor in der Backentasche verwachsen. Einige Male fanden wir sogar, daß die Metastasen in den Halslymphknoten die Größe des Primärtumors überschritten hatten. Auch die Axillalymphknoten waren sehr häufig befallen, besonders bei dem therapeutisch schlecht zu beeinflussenden Tumor GBH-228. Sie waren meist linsengroß, konnten aber auch bis zu 12 mm Durchmesser erreichen. In einzelnen Fällen war der linke Axillalymphknoten mit dem Tumor verwachsen und reichte zusammen mit ihm bis unter die linke Scapula und an die Brustwirbelsäule heran.

Auch der Tumor GW-176 zeigte einige Besonderheiten in seiner lymphogenen Ausbreitung. Bei ihm fanden wir gehäuft Metastasen in den Lymphknoten des Brust- und Bauchraumes. So sahen wir unter anderem linsengroße Metastasen entlang der Rippen-Wirbel-Grenzen an jeder einzelnen Rippe, ungefähr dem ductus thoracicus lateralis entsprechend. Verhältnismäßig oft waren auch die Brustwirbelkörper von dieser Geschwulst umwachsen. Ein besonderes Erscheinungsbild von Metastasen sahen wir am Zwerchfell. Bei etwa 11% der Tiere mit dem Tumor GW-176 fanden wir eine dicke Membran auf der thorakalen Seite des Zwerchfells, die sich mikroskopisch als Metastasierung darstellte. Das makroskopische Bild zeigte eine pflasterartige Ausbreitung der Metastasen über das gesamte Zwerchfell. Ein weiteres besonderes Auftreten von Tochtergeschwülsten zeigte sich einige Male bei verschiedenen Tiergruppen. Stecknadelkopf- bis erbsengroße Metastasen, oft mehrere nebeneinander, entdeckten wir am Peritoneum in Höhe der Nieren, häufiger links als rechts. Der Sitz der Metastasen entsprach der Lnn. subilici, aber auch den Stellen, an denen wir die Medikamente injizierten. Die Injektionen könnten eine Rolle für die Absiedelung gespielt haben. Solche Metastasen traten verhältnismäßig spät auf.

Andere, lediglich vereinzelt vorkommende Metastasen in den Lymphknoten lagen retrosternal oder am Rippenbogen. Die eindruckvollsten makroskopisch sichtbaren Tochtergeschwülste fanden wir an den Nieren. Hier sahen wir fein-

fleckige, feinknollige bis grobknollige Veränderungen an der Oberfläche, die manchmal so stark gewuchert hatten, daß sie mit dem umgebenden Gewebe verwachsen waren. Auch die Milz war manchmal in dieses Paket mit einbezogen und einige Male zusätzlich noch von vergrößerten Lymphknoten perlenartig umgeben, wobei das Organ selbst nicht befallen war. Viel seltener sahen wir Lymphknoten metastasen am Magen. Waren vergrößerte Lymphknoten vorhanden, so befanden sie sich an der kleinen Kurvatur oder zwischen Ösophagus und Fundus. Im Dünndarmkonvolut trat regelmäßig ein vergrößerter Lymphknoten an der Wurzel der Mesenterialgefäße, der A. mesenterica cranialis, auf und erreichte in fast allen Fällen Erbsengröße (Ln. jejunalis). Eine nicht ganz seltene Erscheinung war die Metastasierung am Herzen. Meist an der Herzspitze gelegen, sahen wir hirse- bis reiskorngroße, weiße Knötchen, die sich mikroskopisch als Metastasen erwiesen.

Die folgenden mikroskopischen Präparate zeigen Tumorgewebe aus der Peripherie der Geschwülste, die in der Regel innerhalb 16 Tage in der Hamsterbackentasche gewachsen waren. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 1.000 x.

Die histologisch untersuchten Lymphknoten waren in fast allen Fällen vollkommen mit Krebsgewebe durchsetzt, unter weitgehender Aufhebung ihrer Struktur.

Die Lungen waren als erstes Kapillargebiet für die Tumorzellen nach ihrem Übertritt ins Blut am häufigsten und in etwa gleicher Stärke befallen. Unterschiede bei den Tumoren festzustellen war hier sehr schwierig, da immer wesentliche Partien der Lunge durchwuchert waren. Deshalb suchten wir aus allen Versuchsgruppen die Tiere heraus, die mit Natulan behandelt worden waren, da sie nur wenige Metastasen in den Lungen aufwiesen. Auf diese Weise sahen wir bei GW-127 die Metastasenausbreitung hauptsächlich von subpleural ausgehen, während sie bei GW-176 vorwiegend als Rundherdbildungen im zentralen Lungenparenchym erfolgte. Das charakteristische Bild der GBn-228 Metastasen waren kleine, aber viele Rundherde im Parenchym, die sich vornehmlich um perivaskuläre Lymphgefäße gruppierten.

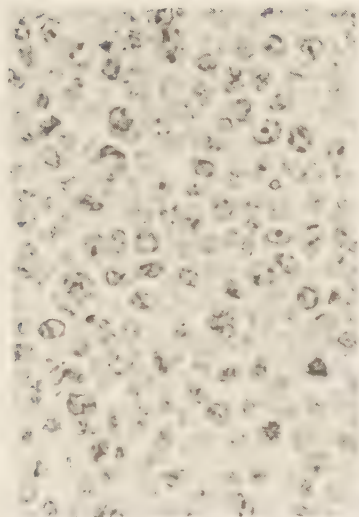


Abb. 43 Tumorgewebe von
GW-127, Gen. 89

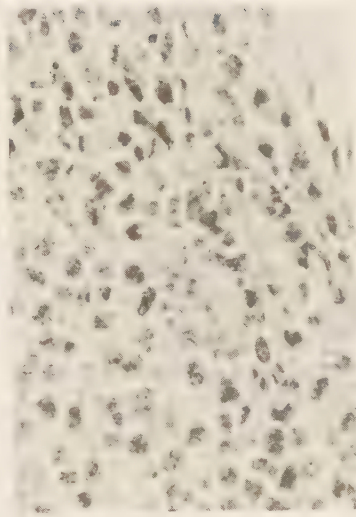


Abb. 44 Tumorgewebe von
GW-176, Gen. 54

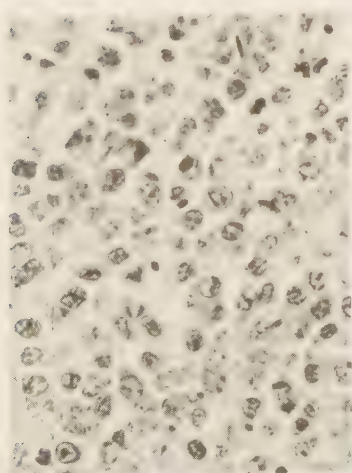


Abb. 45 Tumorgewebe von
GBH-228, Gen. 17

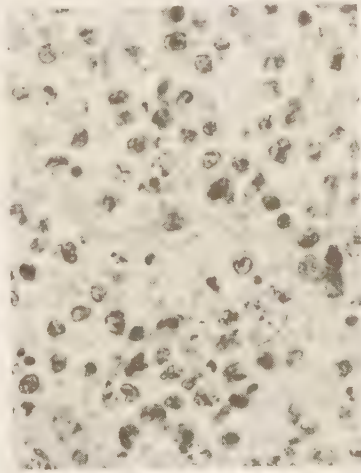


Abb. 46 Tumorgewebe von
GW-336, Gen. 22

Die schon makroskopisch sichtbaren Metastasen im Herz zeigten sich im mikroskopischen Bild als knotige Herde im Myocardium, waren aber immer so geartet, daß sie sich kaum in den Ventrikel vorwölbt. Die Tumorzellen fanden wir auch vereinzelt zwischen die Herzmuskelfasern infiltrierend, im Großen und Ganzen doch Rundherde bildend. Wir hatten nicht den Eindruck, daß die Metastasierung durch Einwucherung vom Mediastinum oder vom Lungenhilus über Perikard und Epikard geschehen war. Es muß vielmehr die Metastasierung hämatogen erfolgt sein.

Metastasen in der Leber stellten wir verhältnismäßig wenig fest. Nur ungefähr 16% aller seziierten Hamster sind an Lebermetastasen erkrankt gewesen. Diese verteilten sich wie folgt auf die einzelnen Tumorgruppen.

LEBERMETASTASEN

	befallene Tiere (%)	davon (%)	
		Rundherde	diffus
GW-127	9,6	80	20
GW-176	17,3	62	38
GBH-228	23,0	77	23
GW-336	6,2	—	100

Abb. 47 Verteilung der Lebermetastasen in Prozent der befallenen Tiere.

Die Ansiedelung der Geschwulstzellen in der Leber war auf zwei Arten erfolgt, entweder durch diffuse, sinusoidale Ausbreitung einzelner Tumorzellen oder ganzer Verbände, oder durch Bildung von teilweise sehr großen Rundherden (bis 5 mm Ø) zusammen mit der sinusoidalen Ausbreitung. Die Rundherdbildung besaß keine bestimmte Lokalisation. Wir fanden sie zu gleichen Teilen mitten im Leberparenchym, sowie kapselnah, wobei die Abgrenzung leicht erkennbar war. Eine ähnliche Anordnung sahen wir in den Nieren. Auch hier waren herdförmige Metastasen zu sehen, doch lagen die Tumorzellen zwischen den Parenchymzellen der Nieren. Am häufigsten war die Lokalisation in der Nierenrinde, sehr selten im Mark.

Die Nebennieren zeigten ihren Befall schon durch eine äußere Vergrößerung an. Die Ausbreitung der Tochtergeschwülste war meist auf die Rinde beschränkt. Bei Tieren mit langer Überlebenszeit kam es einige Male zum Einbruch von Krebszellen ins Mark. Einen Totalbefall fanden wir in keinem Tier.

III. Einfluß der operativen Entfernung des Tumor- implantates auf die Lebenszeit der Tiere

1. Vergleiche unter den einzelnen Tumorformen.

Die Metastasierung aller vier Tumoren war weit ausgebreitet. Sie reichte von den Halslymphknoten bis zum Knochenmark der Tiere. Entweder kam es zu diffuser Ausbreitung oder zu einer massiven, örtlich umschriebenen Invasion in Form der Rundherde und mitunter auch zur Kombination beider Formen. Interessante Metastasenergebnisse erbrachten die Vergleiche zwischen:

Kontrollgruppen ohne eine Chemotherapie	= K
OP-Kontrollgruppen ohne eine Chemotherapie	= OP-K
Tiere mit einer Chemotherapie	= Th
Tiere mit einer Chemotherapie und Extirpation des implantierten Tumors	= Th-OP

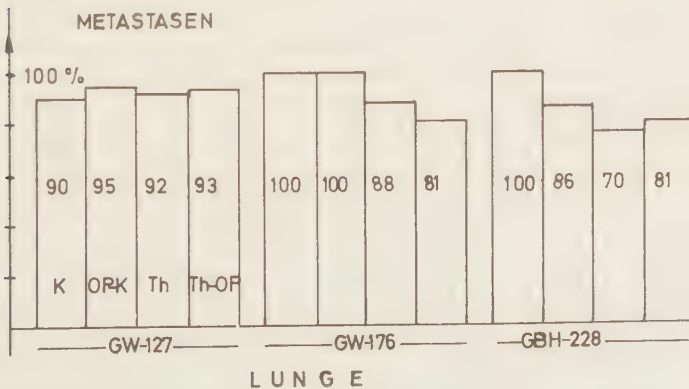


Abb.48 Befall der Lunge in den einzelnen Versuchsgruppen.

**LEBER**

Abb.49 Befall der Leber

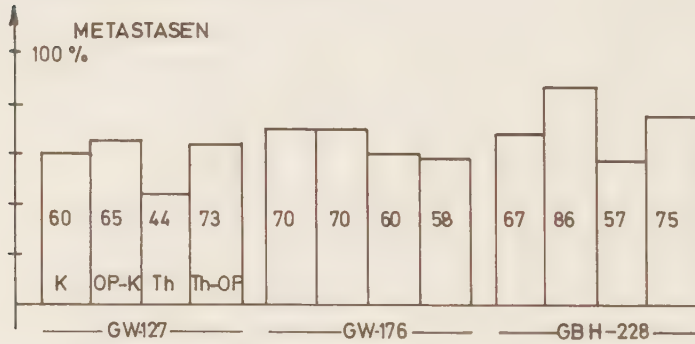
**NIERE**

Abb.50 Befall der Niere

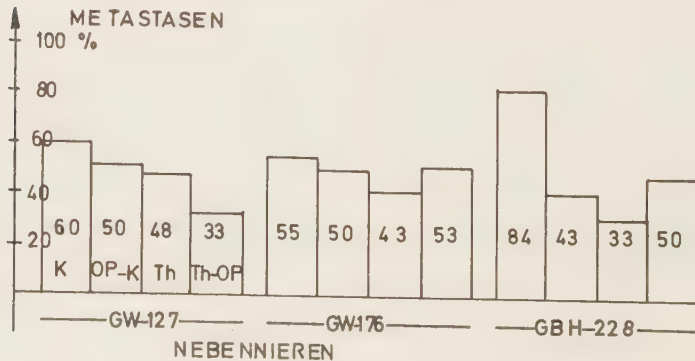
**NEBENNIEREN**

Abb.51 Befall der Nebenniere

Die Abbildungen 48-51 zeigen den Metastasenbefall von Lunge, Leber, Niere und Nebenniere ausgedrückt in Prozent der betroffenen Tiere. Die einzelnen Säulen von links nach rechts geben jeweils den Befall bei einem Tumor in den oben genannten Gruppen an.

Die Befunde der Metastasierung in den Fällen mit und ohne Entfernung des Tumors wichen oft voneinander nicht sehr ab. Die Lungenmetastasierung wurde wenig beeinflusst, besonders bei GW-127. Im Falle von GW-176 und GBH-228 nahm die Häufigkeit der Lungenmetastasen gering ab. Die Metastasierung in der Leber wiederum zeigte vollkommen unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 52). Bei GW-127 tauchten solche überhaupt nur im Chemotherapieversuch mit Resektion in 30% der Hamster auf. Geringe Veränderungen zeigten sich bei GW-176. Nur bei GBH-228 veränderte sich die Anzahl der Tochtergeschwülste unter jeder Behandlung.

LEBER—METASTASENBEFALL (%)

	Kontr.	OP-Kontr.	Therapie	Th.+OP
GW-127	0	0	0	30
GW-176	20	0	17	19
GBH-228	33	7	21	16

Abb. 52 Absiedelung von Metastasen in der Leber unter verschiedener Behandlung, angegeben in Prozent der befallenen Tiere.

Die Nieren zeigten in den Versuchen mit Resektion fast immer eine verstärkt auftretende Metastasierung (Abb. 50). Bei den Nebennieren jedoch verringerten die Chemotherapie alleine, die Resektion des Tumors und auch die Kombinationsbehandlung die Bildung von Tochtergeschwülsten (Abb. 51). Bei dieser Art der Betrachtung könnte der Eindruck entstehen, daß besonders bei den Lungenmetastasen, gleich welche Therapie angewandt worden war, eine Verbesserung nicht zu erreichen war (siehe Abb. 48). Hier besaßen 90% der Kontrolltiere Metastasen, 95% der OP-Kontrolltiere ebenfalls und 92% der Chemotherapietiere auch. Diese Vermutung wird jedoch korrigiert durch die festgestellte längere Lebenszeit der Tiere mit Chemotherapie oder Resektion des Tumors.

Der wichtigen Frage, ob die Resektion ein auslösendes Moment zur vermehrten Metastasierung sein könnte sind wir noch weiter nachgegangen. In unserem Sektionsgut fanden wir immer wieder Metastasen an ungewöhnlichen Stellen im Körper der Tiere. Es war eigenartig, daß diese Tochtergeschwülste zum größten Teil in Tieren vorkamen, deren Tumor reseziert worden war.

METASTASEN (%)

Ort	Gesamt	Nicht OP	Davon Kontr.	OP-Tiere (Gesamt)	Davon OP-Kontr.
Herz	69	27	13,5	73	23
Zwerchfell	7,5	17	0	83	0
Besondere lymphat. Metastasen	9,4	10	0	90	7,5

Abb. 53 Prozentualer Metastasenanteil aller Versuchstiere unter Berücksichtigung der verschiedenen Behandlungswege, besonders der Resektion.

Eine große Anzahl der Tiere mit dem Tumor GBH-228, denen die Geschwulst in der Backentasche entfernt worden war, hatte Tumorzellabsiedelungen im Herzen. Dieses, nach Erfahrung beim Menschen ungewöhnliche Ergebnis läßt sich aber in die allgemein ziemlich hohen Befallszahlen der übrigen Organe bei diesem Tumor einordnen. Ein Vergleich aller ungewöhnlichen Metastasen in den Versuchstieren zeigt aufschlußreiche Ergebnisse. Der Nichtbefall des Zwerchfells und die fehlenden "besonderen lymphatischen Metastasen" bei GW-127 waren besonders auffallend.

METASTASEN DER VERSUCHSTIERE (%)

Ort	TU	Gesamt	Davon OP
Herz	GW-127	9,6	5,8
	GW-176	4,8	3,6
	GBH-228	16,0	12,5
Zwerchfell	GW-127	0	0
	GW-176	10,8	10,8
	GBH-228	10,7	3,6
Besondere lymphat. Metastasen	GW-127	0	0
	GW-176	13,5	14,3
	GBH-228	7,1	5,4

Abb. 53 Prozentangaben der Anzahl der Versuchstiere mit ungewöhnlichen Metastasen bei den von uns untersuchten Tumoren sämtlicher Generationen.

2. Deutung dieser Ergebnisse

Aus unseren Versuchen läßt sich schließen, daß ein kleiner operativer Eingriff, der außerdem noch darauf ausgerichtet war, möglichst kein Übertreten von zusätzlichen Tumorzellen ins Blut zu gestatten, einige Male einen Anstieg der Bildung von Tochtergeschwülsten in bestimmten Organen hervorgerufen hat. Das Übertreten von Krebszellen aus dem Tumor in den Kreislauf war während des Eingriffs wegen der Abklemmung der Backentasche nicht möglich. Daß trotzdem die Metastasenfrequenz ansteigen konnte ist vielleicht durch eine operativ bedingte Freisetzung von thromoplastischen Substanzen (GASTPAR (11)) zu erklären, die zu einer erhöhten Klebrigkeit der schon im Blut befindlichen Tumorzellen mit verstärkter Metastaseninduktion führte, ein Hinweis, welche Folgen ein operativer Eingriff auf die Bildung von Metastasen haben kann.

Weitgehende Resektion eines Tumors zusammen mit gezielter Chemotherapie zur Schädigung oder Vernichtung von vermehrt bei einem operativen Eingriff hämatogen streuenden Tumorzellen müssen weiterhin das Ziel einer wirksamen Krebsbekämpfung sein. Es muß mit großen Abweichungen im Therapieerfolg gerechnet werden, da noch keine spezifisch wirkenden Medikamente zur Verfügung stehen, die eine Heilung gewährleisten können.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde mit Hilfe von in die Backentasche von Hamstern (*Mesocricetus auratus*) verpflanzten Humantumoren (Ovarialkarzinom, Magenkarzinom, Ösophaguskarzinom, monstrozelluläres Sarkom) versucht die Metastasierung zu verfolgen und mit Medikamenten zu beeinflussen. Einzelheiten des Metastasierungsweges und des zeitlichen Ablaufs wurden am Beispiel des Tumors GW-127 (Ovarialkarzinom) beobachtet.

Ausgangspunkt für alle unsere Untersuchungen war die Injektion einer 7%igen Tumorzellsuspension in eine Backentasche der Hamster.

Wir konnten nachweisen, daß sich bereits 5-6 Stunden nach der Injektion der Tumorzellsuspension in die Backentasche vitale Tumorzellen im arteriellen Blut der Wirtstiere befanden. Anschließend trat dabei ein tumorzellfreies Intervall von etwa 120 Stunden auf, während später erneut Krebszellen nachzuweisen waren.

Eine zu verschiedenen Zeiten (1 Stunde bis mehrere Tage) durchgeführte Resektion des implantierten Tumorzewebes zeigte, daß sich die ersten Metastasen schon innerhalb 48 Stunden manifestiert hatten. Nach mehreren Tagen bewirkten sie in der Regel den Tod der Tiere.

Mit einem Antikoagulantium und einem Fibrinolytikum wurde die Ansiedelung von Tumorzellen an den Blutgefäßwänden zu verhindern versucht. Aber auch mit hohen Dosen konnte keine Verbesserung der Überlebenszeit der Tiere erreicht werden, obwohl sich in einigen Fällen eine Metastasenverringering zeigte. Wir konnten mit einer eigenen Methode zeigen, daß sich bei dieser Behandlung neu überpflanzte Tumorzellen im nächsten Tier bösartiger im Bezug auf die Lebenszeit der Hamster auswirkten.

Die Ausbreitung der Tumorzellen führte schließlich in den meisten Organen der Tiere zu Metastasen, wenn auch mit unterschiedlicher Häufung.

Bei mehreren Zytostatika beobachteten wir eine Verzögerung im Tumorwachstum, eine Lebensverlängerung und eine etwas geringere Gewichtsabnahme im Gegensatz zu unbehandelten Tieren. Es zeigte sich ferner eine unterschiedliche Wirkungsstärke der Zytostatika bei den verschiedenen implantierten Tumoren. Wir verglichen weiterhin die Therapieerfolge an Tieren, bei denen der Primärtumor zusätzlich reseziert worden war. Nur zwei zytostatische Mittel, Endoxan und Natulan, zeigten einen recht guten Erfolg und konnten vielfach mit dem der alleinigen operativen Tumorentfernung konkurrieren.

Es wurde zum Schluß auch der mögliche Einfluß einer Operation auf die Metastasenbildung untersucht. Dabei kam es zu dem überraschenden Ergebnis, daß mit der Resektion des Tumors in einem höheren Prozentsatz Metastasen an normalerweise nicht befallenen Organen auftraten.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGOSTINO, D., E. E. CLIFFTON
Decrease of pulmonary metastases:
Potentiation of nitrogen mustard
effect by heparin and fibrinolysin.
Ann.Surg. 157:400 (1963)
2. BAUER, K. H.
Das Krebsproblem.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer
1949
3. BILLINGHAM, R. E., W. K. SILVERS.
Studies on cheek pouch homografts in
Syrian hamsters.
Ciba Foundation Symposium on Transplan-
tation. Boston 1962 S.90
4. BILLINGHAM, R. E., W. K. SILVERS.
Skin transplants and the hamster.
Sci.Americ. 208 (1963)
5. BILLINGHAM, R. E., L. W. FERRIGAN, W. K. SILVERS.
Cheek pouch of the Syrian hamster and
tissue transplantation immunity.
Science 132 (1960)
6. FISHER, B., E. R. FISHER.
The interrelationship of haematogeneous
and lymphatic tumor cells dissemination.
Surg.Gyn.Obstet. 122:791 (1966)
7. FISHER, B., E. R. FISHER.
Host factors influencing the develop-
ment of metastases.
Surg.Clin.N.Amer. 42:335 (1965)
8. FISHER, B., E. R. FISHER.
Experimental studies of factors which
influence hepatic metastases.
Effects of anticoagulants.
Surgery 50:240 (1961)

9. FULTON,G.P.,R.G.JACKSON,B.R.LUTZ.
Cinephotomicroscopy of normal blood
circulation in the cheek pouch of
the hamster.
Science 105:361 (1947)
10. GASTPAR,H.
Metastasierung und Blutgerinnung.
Dtsch.Arbeitsgemeinschaft für Blut-
gerinnungsforschung. Wien 1967
S.119-132 F.K.Schattauer Verlag
Stuttgart
11. GASTPAR,H.
Zirkulierende Tumorzellen und zyto-
statische Chemotherapie unter den
Aspekten neuerer,experimenteller
Untersuchungen.
HNO Bd. 1968 Heft 7
12. GOLDENBERG,D.M.,S.WITTE,K.ELSTER.
GW-39:A new human tumor serially trans-
plantable in the golden hamster.
Transplantation 4,760-763 (1966)
13. GOLDENBERG,D.M.
Die Verwendung einiger,neuer Human-
Tumorstämme in der experimentellen
Krebsforschung. 1.Teil.
Archiv für Geschwulstforsch.
Bd.29 Heft 1 S.1-17 (1967)
14. GOLDENBERG,D.M.
Die Verwendung einiger,neuer Human-
Tumorstämme in der experimentellen
Krebsforschung. 2.Teil
Archiv für Geschwulstforsch.
Bd.29 Heft 1 S.18-35 (1967)
15. GOLDENBERG,D.M.,E.MÜLLER,S.WITTE.
In vivo proliferation of hetero-
transplanted human cancer cells.
Europ.J.Cancer 3:315-319 (1967)

16. GOLDENBERG, D.M., S. WITTE, E. MÜLLER.
Über fortgesetzte Transplantation
eines menschlichen Ovarialkarzinoms
im Syrischen Goldhamster.
Z. Krebsforschung 67:221-223 (1965)
17. GOLDENBERG, D.M., H. GÖTZ
On the "human" nature of highly malignant
heterotransplantable tumors of human
origin.
Europ. J. Cancer 4:547-548 (1968)
18. GOLDENBERG, D.M.
The human tumor-hamster host testing
model: A reappraisal.
4th Annual Meeting, Amer. Soc. Clin.
Oncology, Abstract No. 12 (1968)
19. GOLDENBERG, D.M.
In Vorbereitung.
20. HALEY, H.B., A.N. STROUD.
Constancy of chromosome Karyotype in
human tumors H.Ad.No. 1 and H.Ep.No. 3
maintained in laboratory animals.
Cancer Res. 24:639 (1964)
21. HERTZ, R.
Choriocarcinoma of woman maintained in
serial passage in hamster and rat.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 102:77 (1959)
22. LAWRENCE, E.A., M. J. DUGAN, T. M. OVERLAY.
Further observations on the thrombo-
plastic property of neoplastic tissue
and the effect of its control on the
distribution of intravenous implant.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 1:32 (1953)
23. LAWRENCE, E.A., D. BOWMAN, D. B. MOORE, G. J. BERNSTEIN.
A thromboplastic property of neoplasms.
Surg. Forum 3:694 (1953)

24. LEVAN, A.

Chromosome studies on some human tumors and tissue of normal origin grown in vivo and in vitro at the Sloan-Kettering Institute.

Cancer 9:648 (1956)

25. LONG, L., O. JONASSON, S. ROBERTS, R. Mc. GRATH, E. Mc. GREW, W. H. COLE.

Cancer cells in blood.

Arch. Surg. 80:910 (1960)

26. MILES, C. P.

Chromosomes of some heterotransplanted human tumors. J. H. Emb. Rh. No. 1, H. S. No. 1 and ME 1.

Nat. Cancer Institute 34:103 (1965)

27. MILLER, J. A., E. C. MILLER.

The carcinogenic aminoazo dyes.

Advanc. Cancer Res. 1:339 (1953)

28. MIOTTI, R.

Die Lymphknoten und die Lymphgefäße des Syrischen Goldhamsters.

Acta. anat. 46:192-216 (1961) Basel.

29. ROBERTS, S., A. L. WATNE, R. G. Mc. GRATH, E. A. Mc. GREW, W. H. COLE.

The response of cancer cells in the circulating blood of surgical stress and chemotherapy.

Surg. Forum. 9:595 (1959)

30. ROMSDAHL, A. D., E. W. CHU, R. HUME, R. R. SMITH.

The time of metastases and release of circulating tumor cells as determined in an experimental system.

Cancer 14:883 (1961)

31. SEELIG, K. J., L. RÖVESZ.

Effect of lethally damaged tumor cells upon the growth of admixed viable cells in diffusion chambers.

Brit. J. Cancer 14:125 (1960)

32. WALTHER, H. L.

Krebsmetastasen.

Zürich, Verlag Benno Schwabe, Basel 1948

33. WITTE, S., D. M. GOLDENBERG, K. Th. SCHRICKER.

Die Ausbreitung von Fluoreszenzfarbstoffen in der Hamsterbackentasche.

Z. ges. exp. Med. 148:72-80 (1967)

34. WITTE, S., D. M. GOLDENBERG, K. Th. SCHRICKER.

Mangel an Lymphgefäßen als Ursache der immunologischen Privilegierung der Hamsterbackentasche.

Klin. Wschr. 43:1182 (1965)

35. WOOD, S. jr.

Experimental studies on the intravascular dissemination of ascitic V2-carcinoma cells in the rabbit, with special reference to fibrinogen and fibrinolytic agents.

Bull. Swiss Acad. Med. Sci. 20:92 (1964)

36. WOOD, S. jr.

Pathogenesis of metastases formation observed in vivo in the rabbit ear chamber.

Arch. Path. 66:550 (1958)

37. WOOD, S. jr., E. D. HOLYOKE, J. H. YARDLEY.

Mechanism of metastases production by bloodborne cancer cells.

Canad. Cancer Conf. 4:167 (1967)

38. ZEIDMAN, J., J. M. BUSS.

Transpulmonary passage of tumor cell emboli.

Cancer Res. 12:731 (1952)

39. ZEIDMAN, J., W. J. GAMBLE, W. L. CLOVIS.

Immediate passage of tumor cell emboli through the liver and kidney.

Cancer Res. 16:814 (1956)

40. ZEIDMAN, J.

The fate of circulating tumor cells.

I. Passage of cells through capillaries.

Cancer Res. 21:38 (1961)

L E B E N S L A U F

Am 22. April 1942 wurde ich als zweites Kind des Reg. Amtmanns Kurt Steinborn und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Buchwald in Oppeln/OS geboren.

Im Januar 1945 mußten wir unsere Heimat verlassen und wohnen nun seit Ende 1945 in der Bundesrepublik. Nach dem Besuch der Volksschule in Fürth/Bayern trat ich in die hiesige Oberrealschule ein und legte am 17. Juli 1963 meine Reifeprüfung an der Oberrealschule in Weiden/Opf. mit Erfolg ab. Nach Ableistung meiner Wehrpflicht begann ich das medizinische Studium im Wintersemester 1964 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, wo ich auch nach zwei Semestern das Vorphysikum und weiteren drei Semestern das Physikum ablegte.

Am 24. Juli 1970 habe ich an der gleichen Universität das Medizinische Staatsexamen mit Erfolg abgelegt.

Seit dem 1. August 1970 bin ich als Medizinalassistent an den Städtischen Krankenanstalten in Bayreuth tätig.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
